

Wolfgang Prohaska

**Untersuchungen
über die in vitro-Korrektur
von Faktor VIII-
und Faktor IX- Mangelplasma
durch Protaminsulfat**

1983

Aus dem Physiologischen Institut II
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. Heinz Schröer)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE IN VITRO-KORREKTUR VON
FAKTOR VIII- UND FAKTOR IX-MANGELPLASMA DURCH
PROTAMINSULFAT

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fachbereiche

5 Vorklinische und theoretische Medizin und

6 Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Wolfgang Prohaska

aus Löhne/Westfalen

1983



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Münster

Dekan: Prof. Dr. H. J. Kühle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Zimmermann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. van de Loo

Tag der Promotion: 28.2.1983

Aus dem Physiologischen Institut II
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Referent: Prof. Dr. E. Zimmermann

Korreferent: Prof. Dr. J. van de Loo

Zusammenfassung

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE IN VITRO-KORREKTUR VON FAKTOR VIII- UND FAKTOR IX-MANGELPLASMA DURCH PROTAMINSULFAT

Wolfgang Prohaska

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Gerinnungszeiten von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasmen, gemessen mit der partiellen Thromboplastinzeit, durch Protaminsulfat in der Konzentration von 0,1 mg/ml normalisiert werden können. Faktor XI-Mangelplasma konnte in geringem Ausmaß beeinflußt werden. Polylysin ist ebenfalls gerinnungszeitverkürzend wirksam. Protaminsulfat in der o.g. Konzentration erwies sich bei Mangelplasmen der Faktoren II, X, XII, V, VII und Fletcher-Faktor als ineffektiv. Für die Wirkung ist Kaolin erforderlich, und es kann angenommen werden, daß Protamin eine enzymatische Aktivität erzeugt, während es an Kaolin gebunden ist. Für den Effekt sind die Phospholipide des Tests nicht erforderlich.

Protaminsulfat ist auch in immunologisch erzeugtem Faktor IX-Mangelplasma und in natürlichem Faktor IX-Mangelplasma ohne nachweisbares Faktor IX-Molekül voll wirksam. Dasselbe gilt für Plasmen mit einem kombinierten Mangel der Faktoren VIII und VII sowie IX und VII.

In Versuchen mit an Sepharose immobilisiertem Protamin konnte eine ausgeprägte Affinität der Faktoren II, X, IX und VII zum Protamin nachgewiesen werden. Durch Adsorption von Normalplasma mit Protamin-Sepharose können die Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren auf Werte von 10% reduziert werden.

Aufgrund der erhaltenen Resultate wird angenommen, daß Protaminsulfat eine funktionelle Kopplung des Faktors X an den Startphasenkomplex des Intrinsic-Systems, bestehend aus Kaolin, Faktor XIIa, (Prä-)Kallikrein und hochmolekularem Kininogen, ermöglicht.

Tag der Promotion: 28.2.1983

Handwritten section header.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Meinen Eltern gewidmet

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

Handwritten text block.

	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Physiologische Bedeutung und Prinzip der Blutgerinnung	1
1.2	Molekularbiologische Grundlagen der Blutgerinnung	2
1.2.1	Die Kaskade der Zymogen-Aktivierungen	2
1.2.2	Lipid-abhängige Aktivatorkomplexe	9
1.3	Die Faktor IXa/Faktor VIII-Funktionseinheit und ihre Störungen	11
1.3.1	Struktur- und Funktionsverhältnisse beim Faktor VIII und die Hämophilie A	11
1.3.2	Struktur von Faktor IX und die Hämophilie B	18
1.4	Synthetische Faktor VIII-ähnliche Aktivitäten	20
2.	<u>Material und Methoden</u>	24
2.1	Gerinnungstests	24
2.1.1	Partielle Thromboplastinzeit	24
2.1.2	Thromboplastinzeit nach QUICK	25
2.1.3	Faktoren-Tests	26
2.1.4	Verwendete Plasmen, Antiseren und Substanzen	29

	Seite
2.2 Immunologischer Nachweis von Gerinnungs- faktoren	31
2.2.1 Quantitative Immunelektrophorese nach LAURELL	31
2.2.2 Zweidimensionale Immunelektrophorese	32
2.3 Herstellung von Protamin-Sepharose	33
2.4 Proteinbestimmung nach BRADFORD	34
2.5 Photometrische Bestimmung von Heparin im Plasma mittels chromogenen Substrates	35
3. <u>Ergebnisse</u>	38
3.1 Einleitende Charakterisierung der PTT- Korrektur von Faktor VIII- und Faktor IX- Mangelplasma durch Protaminsulfat	38
3.2 Die Wirkung von Protaminsulfat und Poly- lysin auf verschiedene Mangelplasmen	47
3.3 Der Einfluß der Phospholipide und der Kaolin- aktivierung auf den Protaminsulfat- und Polylysineffekt	55
3.4 Die Zeitabhängigkeit des Protaminsulfat- effektes	59

	Seite
3.4.1	Die Zeitdauer der Protaminsulfatwirkung 59
3.4.2	Der Zeitverlauf der Aktivierungsphase 65
3.5	Die Bedeutung der Kontaktphase der Gerinnung für den Protaminsulfateffekt 77
3.5.1	Die Aktivierung des Testsystems durch Ellagsäure 77
3.5.2	Die Bindung von Protamin an Kaolin 81
3.5.3	Die Aktivierung des Testsystems durch einen Kaolin-Protamin-Komplex 85
3.5.4	Die Testung verschiedener Produkte der Kontaktphase 89
3.6	Die Bedeutung des Faktor VII für den Protaminsulfateffekt - Versuche mit immunologisch erzeugten Mangelplasmen - 93
3.7	Die Bindung verschiedener Gerinnungsfaktoren an Protamin-Sepharose 99
3.8	Die Bestimmung von Heparin in Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasmen 105
3.9	Immunelektrophoretische Bestimmung des F VIII:R:AG und des F IX:AG und die Veränderungen unter Protaminsulfateinfluß 107

4.	<u>Zusammenfassung und abschließende Diskussion</u>	115
	Literaturverzeichnis	121
	Lebenslauf	138

1. Einleitung

1.1 Physiologische Bedeutung und Prinzip der Blutgerinnung

Das Blutgerinnungssystem ist ein komplex aufgebautes biochemisches System, das dazu dient, auch im Verletzungsfall ein ausreichendes intravaskuläres Volumen aufrecht zu erhalten. Die Komponenten des Systems sind Enzyme, Inhibitoren und Co-Faktoren im weiteren Sinne.

Der Effekt einer zuverlässigen Abdichtung eines Gefäßschadens wird letztlich dadurch gewährleistet, daß ein Plasmaprotein, das Fibrinogen, durch enzymatische Einwirkung zunächst aggregiert und danach mittels eines weiteren Enzyms zu unlöslichem Fibrin polymerisiert.

Dieses Polymerisat enthält auch zelluläre Bestandteile, vor allem Thrombozyten, die schon vor der Fibrinbildung der verletzten Stelle anhaften. Die Kombination von Plasmaproteinpolymerisat mit eingeschlossenen, zellulären Elementen bildet eine sich gegenseitig verstärkende Anordnung zum Wundverschluß (1).

Das Grundprinzip der Gerinnung ist in Abb. 1 dargestellt: Durch proteolytische Spaltung und Freisetzung von sog. Aktivierungspeptiden wird eine konformative Änderung des beeinflussten Moleküls erzwungen, das so vom Zymogen zum Enzym - zu einer Serinprotease - übergeführt wird, -oder, im Falle des Fibrinogens, die Fähigkeit erlangt zu aggregieren.

HEMKER et al. (2) konnten zeigen, daß das Modell der Enzymkinetik nach MICHAELIS und MENTEN auch auf Gerinnungsvorgänge anwendbar ist; diese werden üblicherweise untersucht durch die Ermittlung der Zeitdauer bis zur Fibrinbildung.

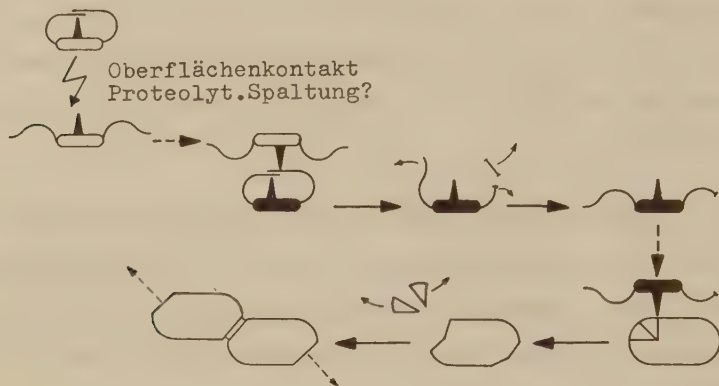


Abb. 1 Schematische Darstellung der partiellen Proteolyse als Aktivierungsprinzip der Blutgerinnung

1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Blutgerinnung

1.2.1 Die Kaskade der Zymogen-Aktivierungen

Allgemein anerkannt sind drei Funktionseinheiten des Blutgerinnungssystems:

- Das endogene Faktor X-aktivierende System; es führt zur Aktivierung des Faktors X nach Kontakt mit Oberflächen, die von der physiologischen Epithelformation abweichen.
- Das exogene Faktor X-aktivierende System; hier wird der Faktor X mit Bestandteilen geschädigter Zellen aktiviert.

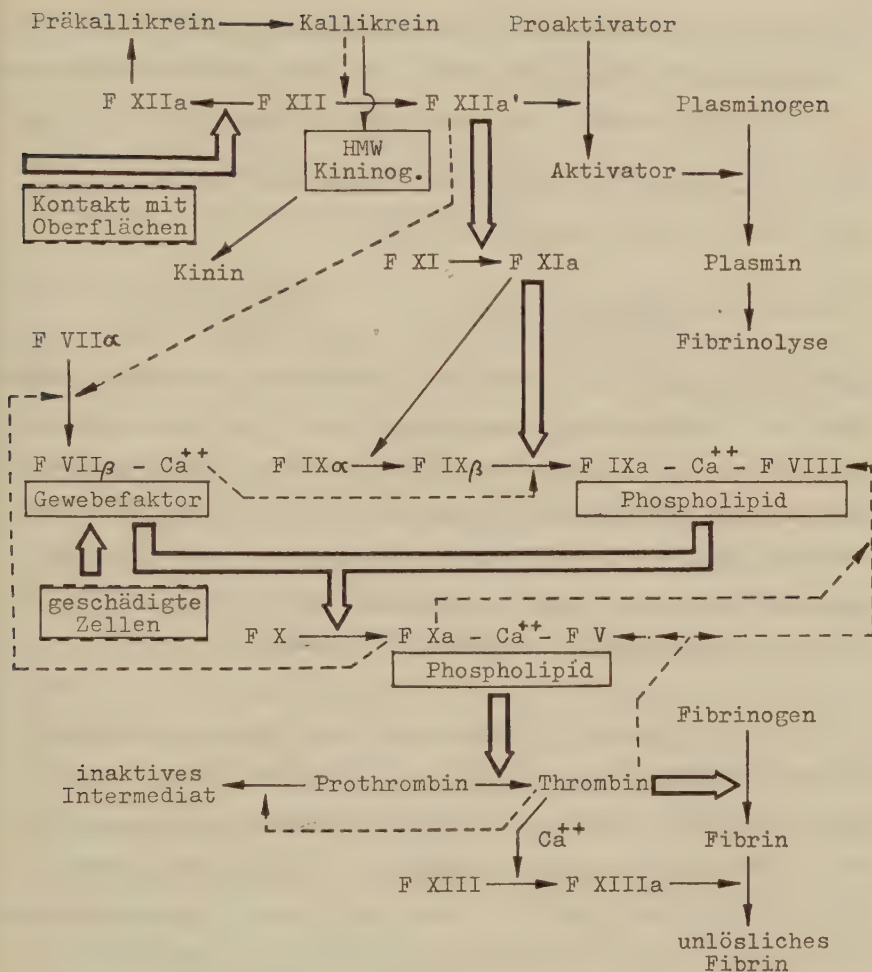


Abb. 2 Übersicht über die Interaktionen der Gerinnungsfaktoren [nach (92), modifiziert]. Die unterbrochenen Pfeile kennzeichnen Rückkopplungswege

- Eine Funktionseinheit, die beide vorgenannten Systeme vereinigt. Sie ruft Reaktionen hervor, die nach erfolgter Faktor X-Aktivierung zur Formation eines Fibringerinnsels führen.

Abb. 2 zeigt eine zusammenfassende Darstellung des im folgenden näher beschriebenen Gerinnungssystems.

1.2.1.1 Das endogene System

RATNOFF und COLOPY (3) beschrieben 1955 einen Patienten, dessen Blut nicht in bekannter Weise durch Kontakt mit Glasoberflächen zur Gerinnung zu bringen war. Sie führten diesen Defekt auf den Mangel eines spezifischen Plasmaproteins zurück, des Hagemann-Faktors (Faktor XII). Für die Verhältnisse in vivo sollte berücksichtigt werden, daß auch subendotheliale Strukturen wie Kollagen den Faktor XII aktivieren können (4).

Genauere Untersuchungen legen einen Zweistufenmechanismus der Faktor XII-Aktivierung nahe: Faktor XII-Moleküle, die zwar gerinnungsinaktiv sind, aber eine nachweisbare enzymatische Aktivität besitzen, spalten und aktivieren einander. Dabei wirkt die Anordnung auf einer bestimmten negativ geladenen Oberfläche (z.B. Kaolin) stark beschleunigend auf diese Autokatalyse (5). Eine andere Auffassung bezieht sich auf die nachgewiesene konformative Änderung des Faktor XII. Nach Kontakt mit aktivierenden Agentien zeigt der Faktor XII als direkte Folge der Umfaltung eine Exponierung aktiver Gruppen, ohne daß eine enzymatische Spaltung stattgefunden hat (6).

Sicher nachgewiesen ist die Umwandlung von Präkallikrein (Flet-

cher-Faktor) durch Faktor XIIa in ein aktives Enzym (Kallikrein) und dessen rückkoppelnd aktivierende Wirkung auf Faktor XII. Durch Vorhandensein von Präkallikrein im Plasma ist somit ein positiver Rückkopplungsmechanismus gegeben, der die Faktor XII-Aktivierung stark beschleunigt (7,8).

Faktor XIIa (d.h. enzymatisch aktiver Faktor XII) oder auch aktive Fragmente davon können eine Fibrinolyse auslösen. Das geschieht über eine Aktivierung des Plasminogenproaktivators, der wahrscheinlich mit Präkallikrein identisch ist (9).

Faktor XIIa, der durch die Einwirkung von Kallikrein entsteht, besteht aus zwei unterschiedlich großen Ketten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Zum einen ist möglich, daß aktiver Faktor XII ohne proteolytische Spaltung entsteht. Zum anderen ist aber auch eine Aktivierung des einkettigen, nativen Faktor XII durch partielle Proteolyse zu beobachten. Der letztgenannte Schritt ist für die Proteasen Kallikrein, Faktor XIa und Plasmin nachgewiesen (10). Welche Bedeutung beide Mechanismen für eine physiologische Gerinnungsauslösung haben, ist bisher nicht geklärt.

Die bekannte Rolle des Faktors XIIa im endogenen Gerinnungssystem ist, den Faktor XI in die Serinprotease Faktor XIa zu überführen. Ein Co-Faktor ist hier anscheinend von Bedeutung.

KURACHI et al. (11) konnten im gereinigten System zeigen, daß eine Aktivierung des Faktors XI bei Anwesenheit verschiedener aktivierender Agentien in quantitativ gleicher Weise mit dem einkettigen wie mit dem zweikettigen bovinen Faktor XII erfolgt.

FUJIKAWA et al. (10) vermuten eine Trennung der Funktion von nativem Faktor XII und zweikettigem Faktor XII: Die erstgenannte molekulare Form sei für die Gerinnungsauslösung verantwortlich, während die proteolytisch gespaltene Form primär einen Starter des fibrinolytischen Systems darstelle.

Der bereits erwähnte Co-Faktor in der Startphase der Gerinnung ist hochmolekulares Kininogen (Fitzgerald-Faktor), dessen Mangel zu einer stark verlängerten PTT führt (12). SCHIFFMAN et al. (13) vertreten die Auffassung, daß die primäre Funktion des Fitzgerald-faktors in einer Beschleunigung der Faktor XII-Aktivierung liegt, wohingegen andere Autoren seine Bedeutung vor allem in der Funktion als Co-Faktor bei der Aktivierung von Faktor XI sehen (14).

Durch den Faktor XIa wird der Faktor IX in einem zwei Schritte umfassenden Mechanismus, der Kalzium-Ionen erfordert, in den aktiven Faktor IXa umgewandelt (15). Die Serinprotease Faktor IXa stellt das enzymatische Korrelat des Faktor X-aktivierenden Komplexes dar.

Die geringe Fähigkeit von Faktor IXa, den Faktor X umzusetzen, wird durch eine Komplexformation mit Faktor VIII, Kalzium-Ionen und Phospholipiden, vielfach verstärkt (16,17). In Abwesenheit von Faktor IXa ist Faktor VIII nicht in der Lage, Faktor X zu aktivieren (16).

Es ist ein zwar interessanter, aber leider unklarer Befund des endogenen Gerinnungssystems, daß hochgradige angeborene Mangelzustände an Faktor XII, Fletcher- und Fitzgerald-Faktor, nicht zu einer klinisch manifesten hämorrhagischen Diathese führen (18).

Daher müssen alternative Mechanismen angenommen werden. Berichtet wurde über eine Aktivierung des Faktors XI durch die Interaktion von Thrombozyten mit Kollagen (19) sowie über eine Aktivierung von Faktor IX durch Bestandteile polymorphkerniger Leukozyten (20).

1.2.1.2 Das exogene System

Wenn Plasma oder Blut dem Einfluß eines Lipoproteins ausgesetzt wird, das sich aus vielen Geweben isolieren läßt, wird eine Aktivierung des Faktors X beobachtet (21).

Für eine Aktivierung von Faktor X durch dieses Gewebsthromboplastin ist eine enzymatische Aktivität erforderlich, die durch Faktor VII repräsentiert wird. Faktor VII zirkuliert im Plasma in seiner einkettigen Form, die bereits einen aktiven Serinrest aufweist. Eine zweikettige Form mit 80-fach höherer Aktivität tritt auf, wenn Faktor VII bestimmten proteolytischen Aktivitäten ausgesetzt wird (22). Dem Gewebsthromboplastin kommt wahrscheinlich die Aufgabe zu, Faktor VIIa zu seinem Substrat, dem Faktor X, räumlich so zu orientieren, daß die enzymatische Aktivität des Faktors VIIa am Faktor X wirksam werden kann (23).

1.2.1.3 Die gemeinsame Endstrecke

Bei der Aktivierung des Faktors X, entweder durch den Faktor IXa-Faktor VIII-Komplex oder durch den Faktor VIIa-Gewebsfaktorkomplex, kommt es in zwei Schritten zur Abspaltung von Aktivierungspeptiden, wobei bereits nach der Lösung des ersten Peptides die volle Gerinnungsaktivität erreicht wird (24). Faktor Xa führt in Gegenwart von Phospholipiden, Kalzium-Ionen und Faktor V, Prothrombin (Faktor II) in Thrombin über. Funktionell ergeben sich Paralle-

len zwischen den Faktoren V und VIII: Faktor V weist, wie der Faktor VIII, keine enzymatische Aktivität auf.

Der relativ gut erforschte Mechanismus der Prothrombinaktivierung führt zu der doppelkettigen Serinprotease Thrombin, die eine dem Trypsin ähnliche Spezifität aufweist (25).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß der Blutgerinnung eine Serinproteasen-Kaskade zugrunde liegt, die Verstärkungsfunktion hat. Nach ELÖDI und VARADI (17) ist ein Mol Faktor XIa imstande 2×10^8 Mol Fibrinmonomeren zu bilden.

Fast alle Serinproteasen, bis auf Faktor VIIa (26), können durch einen natürlichen Inhibitor, das Antithrombin III (AT III) gehemmt werden. Die Hemmwirkung des AT III wird durch die Anwesenheit des Glykosaminoglykans Heparin erheblich verstärkt.

Regelmechanismen in der Gerinnungskaskade sind über die nicht-enzymatischen Co-Faktoren gegeben. So werden Faktor VIII und Faktor V durch Thrombin in ihrer Wirkung verstärkt (27,28).

Durch die zeitlich differente Verfügbarkeit der Phospholipide für den Faktor X-formierenden Komplex und den Prothrombin-aktivierenden Komplex sind weitere Kontrollmöglichkeiten vorhanden (29).

Das Gerinnungspotential kann über die Freisetzung von Faktor VIII durch vasoaktive Substanzen beeinflußt werden. So führen β -adrenerge Verbindungen und Vasopressin-Abkömmlinge zu einer Steigerung der Faktor VIII-assoziierten Aktivitäten (siehe auch unter 1.3.1) und des Plasminogenaktivators (30,31).

Zum Schluß sei erwähnt, daß eine strenge Trennung von endogenem und exogenem System nicht sinnvoll erscheint. Es wurde in diesem Zusammenhang über den aktivierenden Einfluß des Faktors XIIa auf den Faktor VII berichtet (32,33), Faktor Xa kann Faktor IX aktivieren (34), und auch eine Faktor IXa-Bildung durch Faktor VIIa und Gewebsthromboplastin ist beschrieben worden (35).

1.2.2 Lipidabhängige Aktivator Komplexe

An mindestens drei Positionen des Gerinnungssystems werden gerinnungsaktive Komplexe mit einem Lipidanteil gebildet; nämlich:

- der endogene Faktor X-aktivierende Komplex aus Faktor IXa, Faktor VIII, Kalzium-Ionen und Lipiden;
- der Prothrombin-aktivierende Komplex aus Faktor Xa, Faktor V, Kalzium-Ionen und Lipiden;
- der exogene Faktor X-aktivierende Komplex aus Faktor VIIa, Kalzium-Ionen und einem Lipoprotein, dem Gewebsthromboplastin.

Für die Gerinnung spielen Phospholipide die entscheidende Rolle. Phospholipide besitzen einen hydrophilen und einen hydrophoben Pol. Wegen der damit verbundenen grenzflächenaktiven Eigenschaft bilden sie in wässrigen Lösungen spontan geschlossene Doppelschichtstrukturen, die, je nach Bedingung, als unilamelläre Vesikel oder mehrschichtige sog. Liposomen auftreten (36).

Die Funktion der Lipide bei der Blutgerinnung stellt man sich so vor, daß sie als katalytische Oberfläche dienen, auf der sich die Enzyme mit den zugehörigen Co-Faktoren formieren können. Die Annäherung und Bindung von Enzym und Co-Faktor sowie die

Bildung von Reaktionsketten der Aktivatorkomplexe sind durch die lateralen Bewegungen der Komponenten auf der Lipid-Wasser-Grenzschicht möglich.

Für eine optimale gerinnungsfördernde Wirkung sind vor allem eine negative, gleichmäßig verteilte Oberflächenladung und nukleophile Gruppen für die Formation von Kalziumbrücken bei den Lipiden erforderlich (36).

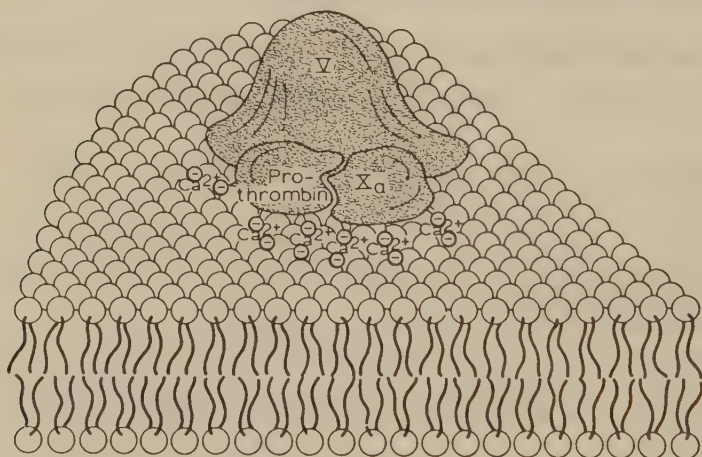


Abb. 3 Schematisches Modell für den Prothrombinase-Prothrombin-Komplex. Dargestellt ist die Anordnung der Faktoren II, Xa und V auf einem Phospholipid-bilayer [aus (36)]

Die molekularen Erfordernisse für eine Lipidbindung des Prothrombins sind relativ gut bekannt. Es finden sich nämlich im Prothrombin als phylogenetische Neuerwerbung γ -Carboxyglutamylreste in der Nähe des N-Terminus, über die eine Kalziumbrücke zu einer negativ geladenen Lipidoberfläche möglich ist (37).

Die γ -Carboxylierung erfolgt postribosomal in der Leber und erfordert Vitamin K. Durch Vitamin K-Antagonisten, wie sie die Coumarinderivate darstellen, kann das Gerinnungspotential erheblich gesenkt werden (38). Für die ebenfalls Vitamin K-abhängigen Faktoren IX, X und VII wird ein analoger Mechanismus der Lipidbindung angenommen (39).

Die Faktoren VIII und V werden wahrscheinlich nicht über Kalzium, sondern über hydrophobe Wechselwirkungen gebunden (36).

Im Organismus werden die Lipide der intrinsischen Aktivatorkomplexe durch Phospholipide der Plättchenmembran dargestellt (40). Eine Thrombininformation auf der Oberfläche von wundhaftenden Thrombozyten ist biologisch sinnvoll. Sie wird in ihrer Bedeutung betont durch die Beobachtung, daß der an das Plättchen gebundene Faktor Xa 300 000-fach aktiver bezogen auf eine aktivierende Proteolyse am Prothrombinist als nicht gebundener Faktor Xa (41).

1.3 Die Faktor IXa/Faktor VIII Funktionseinheit und ihre Störungen

1.3.1 Struktur und Funktionsverhältnisse beim Faktor VIII und die Hämophilie A

Verglichen mit den enzymatischen Gerinnungsfaktoren ist über den Faktor VIII wenig bekannt.

Wenn Faktor VIII aus Zitratplasma mit dem Ziel einer Anreicherung der Gerinnungsaktivität (F VIII:C) gereinigt wird, gewinnt man Komplexe aus mindestens drei Funktionseinheiten:

- Prokoagulatorischen Faktor VIII (F VIII:C), eine Aktivität, die spezifisch den Plasmagerinnungsdefekt der Hämophilie A korrigiert;
- Faktor VIII-assoziiertes Antigen (F VIII:R:AG), ein Protein, das präzipitiert mit heterologen Antikörpern gegen gereinigten Faktor VIII;
- eine Aktivität, die den spezifischen Plasmadefekt des von-Willebrand-Jürgens-Syndroms kompensiert (F VIII:R:WF). Bei diesem Defekt handelt es sich um die verminderte oder aufgehobene Fähigkeit der Thrombozyten, von Glasoberflächen adsorbiert zu werden (42). Weiterhin ist diese Aktivität verantwortlich für die Aggregation von Thrombozyten in Gegenwart des Glykosidantibiotikums Ristocetin (43). Für diese Funktion gilt die Bezeichnung von-Willebrand-Faktor oder Ristocetin-Cofaktor.

Die Plasmaaktivität des F VIII:R:WF ist deutlich negativ korreliert mit der bei Patienten mit von-Willebrand-Jürgens-Syndrom zu findenden Blutungszeitverlängerung (44). Neben den genannten Störungen finden sich beim von-Willebrand-Jürgens-Syndrom verminderte Plasmaspiegel an F VIII:C und F VIII:R:AG (45,46).

Das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom wird autosomal dominant, die Hämophilie (A und B) x-chromosomal rezessiv vererbt (18).

Der Gehalt einer Plasmaprobe an F VIII:C, F VIII:R:AG und F VIII:R:WF wird jeweils in Einheiten pro Milliliter (U/ml) angegeben. Eine Einheit (U) ist diejenige Aktivität, die in einem Milliliter frischem, gepooltem Normalplasma enthalten ist. Auch eine Angabe in Prozenten des Normalen ist üblich. Die Angabe 100% entspricht dann 1 U/ml.

Für die Reindarstellung von Faktor VIII aus Plasma wurden vielfältige Methoden beschrieben. Die bei den verschiedenen Präparationen erhaltenen Molekulargewichte sind sehr unterschiedlich. Die Angaben der Literatur bewegen sich von $0,3 \times 10^6$ bis 20×10^6 (47,48,49). Nach überwiegender Ansicht werden akzeptiert Werte von mehr als einer Million. Die Ursache dieser weit streuenden Angaben könnte sein, daß der Faktor VIII in multiplen molekularen Formen existiert, die durch eine variable Selbstaggregation von Untereinheiten zu erklären wären (50,51).

PERRET et al. (49,52) nehmen ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 500 000 als Untereinheit des selbstaggregierenden Faktor VIII an. Dabei lassen sich für das Dimer und dessen variable Oligomeren Kohlenhydratanteile in einem konstanten Verhältnis zum Protein nachweisen.

Neben der Erforschung des Untereinheitenproblems wurden auch Analysen der stofflichen Zusammensetzung des Faktor VIII durchgeführt. HERSHGOLD et al. (53) erhielten eine 10 000fach gereinigte Präparation aus Humanplasma, die zu 76% aus Aminosäuren, zu 10% aus Kohlenhydraten bestand und einen Lipidanteil von 11% aufwies.

Aufgrund weiterer Untersuchungen kann angenommen werden, daß es sich beim Faktor VIII um einen Glykoproteinkomplex handelt, der durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten wird. Es ist nämlich möglich, den F VIII:C vom F VIIIR:AG und F VIIIR:WF durch Gelfiltration (z.B. an Sepharose 4B) in Gegenwart von Puffern hoher Ionenstärke abzutrennen.

OWEN und WAGNER (54) gelang eine Dissoziation der Faktor VIII-Untereinheiten bei Verwendung von Puffern mit 1 mol/l NaCl und 0,25 mol/l CaCl_2 sowie mit verschiedenen Detergentien.

Und zwar findet sich bei der Gelfiltration von Plasma oder gereinigtem Faktor VIII bei hoher Ionenkonzentration der F VIII:R:AG und der F VIII:R:WF unverändert im Ausschlußvolumen. Der F VIII:C wird jedoch nicht mehr im Ausschlußvolumen, sondern in späteren Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 200 000 gefunden.

Dieser Wert wird auch durch andere Trennungsmethoden wie der Dichtegradientenzentrifugation bestätigt (55).

KANG et al. (56) fanden in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese für den F VIII:C ein Molekulargewicht von 150 000.

Über die chemische Natur des F VIII:C ist kaum etwas bekannt. ROCK et al. (57) stellten einen geringen Anteil an Protein und einen hohen Betrag an Kohlenhydraten fest. Neuraminsäure wurde nicht gefunden.

Die molekulare Grundlage des von-Willebrandfaktors ist ebenfalls unklar. Während man bislang annahm, daß er ein integraler Bestandteil des F VIII:R:AG sei, konnten BARROW et al. (58) zeigen, daß seine Separation vom Antigenanteil möglich ist.

Als molekulare Bestandteile des F VIII:R:WF werden Kohlenhydrate vermutet (59,60).

Die Synthese des F VIII:R:AG erfolgt in Endothelzellen. Weiterhin ist die Lokalisation in Thrombozyten und Megakaryozyten erwiesen (61). Ob dort auch der F VIII:C synthetisiert wird, ist unklar. Eine Syntheseleistung der Leber für den F VIII:C ist

ist erwiesen (62).

In vitro wird F VIII:R:AG von Endothelzellkulturen produziert; es läßt sich jedoch keine Prokoagulantienaktivität nachweisen. Die Ursache dafür könnte eine Protease an der Oberfläche der kultivierten Endothelzellen sein, die den F VIII:C zerstört (63).

Die Hämophilie A

Die Fragestellungen über die molekularen Grundlagen der Hämophilie A sind an die Kenntnisse der Natur des F VIII:C geknüpft, der letztendlich nur durch den korrigierenden Effekt des Plasma-defektes dieser Patienten definiert ist.

Neuere Untersuchungen mit chromogenen Substraten, die es erlauben, die Esteraseaktivität von Gerinnungsenzymen photometrisch zu messen, zeigen eindeutig, daß bei der Hämophilie A die Formation des endogenen Faktor X-Aktivators gestört ist (64).

Dieser Befund stimmt überein mit der bekannten Funktion des Faktors VIII im Gerinnungssystem. Für die Erklärung dieses Funktionsdefektes existieren verschiedene Theorien:

- Nach einer ersten Annahme liegt, je nach dem Schweregrad der Krankheitssymptome, ein totaler oder gradueller Mangel an Faktor VIII vor. Diese Theorie wird unterstützt durch die Korrigierbarkeit des hämophilen Plasma-defektes durch Plasma oder Plasmafraktionen
- Nach einer zweiten liegt ein struktureller Defekt des Faktor VIII-Moleküls vor, der zu dem beobachteten Mangel an biologischer Aktivität führt. Die pathologischen Konsequenzen und

gerinnungsphysiologischen Befunde wären die gleichen wie nach der erstgenannten Annahme.

- Drittens soll ein gegen den aktiven Teil des Faktors VIII gerichteter Inhibitor dessen Wirksamwerden in der Gerinnung verhindern (65,66,67).
- Viertens wird vermutet, daß bei der Hämophilie A eine inaktive Vorstufe des Faktors VIII vorliegt. Die konvertierende Aktivität stehe aber nicht zur Verfügung (68,69):

Neuere Befunde unterstützen die beiden erstgenannten Theorien. Der absolute oder strukturelle Mangel bezieht sich aber nur auf den F VIII:C.

PEAKE et al. (70) verwendeten einen Radio-Immun-Assay, basierend auf einem erworbenen Inhibitor eines Hämophilen. Ein solcher gegen den F VIII:C gerichteter Inhibitor (Immunglobulin der Gruppe G) kann sich infolge der Substitutionstherapie bei Hämophilie A-Patienten entwickeln. Das mit dem Radio-Immun-Assay gemessene Antigen der Prokoagulantienaktivität (F VIII:AG) war bei allen Patienten in gleicher Weise vermindert wie die Gerinnungsaktivität des Faktors VIII.

ROCK et al. (71) konnten jedoch auch mit biochemischen Methoden bei einem Patienten mit Hämophilie A ein F VIII:C-Protein nachweisen, das dem entsprechenden Protein aus Normalplasma sehr ähnlich war.

SHANBERGE und GORE (72) zeigten zuerst, daß Hämophile ein Faktor VIII-assoziiertes Protein aufweisen. Dieses Protein wurde im vorhergehenden als F VIII:AG bezeichnet. Viele Untersuchungen bestätigen, daß dieses Antigen bei allen untersuchten Hämophilen

in Normalwerten nachweisbar ist (46,73).

Die Behandlung von hämophilen Blutungsereignissen erfolgt mit Faktor VIII-Präparationen aus Humanplasma. Während durch ausreichende Substitution von Faktor VIII lebensbedrohende Blutungen und notwendige Operationen beherrscht werden können, ist das Hauptproblem für Patienten mit schwerer Hämophilie A (F VIII:C unter 1%) in den häufig wiederkehrenden Gelenkblutungen zu sehen, die zu bleibenden Körperbehinderungen führen können (74).

Deshalb wird bei Schulkindern auch eine Dauerprophylaxe mit Faktor VIII-Präparaten empfohlen, mit dem Ziel, die Faktor VIII-Aktivität so weit anzuheben, daß spontane Blutungen in die Gelenke nicht mehr auftreten (75). Bereits geringe Aktivitäten (3% der Norm) können dafür ausreichend sein. Verletzungen sind aber unter dieser Prophylaxe nach wie vor bedrohlich.

Die Behandlung ist nicht zuletzt wegen der geringen biologischen Halbwertszeit des F VIII:C (6 -15 h) sehr kostenaufwendig.

Bei Erwachsenen und einem Teil der Kinder hat sich die Heimselbstbehandlung bewährt. Der Vorzug dieser Behandlungsart ist in der frühest möglichen Erzielung eines Blutungsstillstandes und des Zuwachses an Unabhängigkeit der Patienten zu sehen (76).

Für Patienten mit leichter und mittelschwerer Hämophilie A, die kaum zu Spontanblutungen neigen, besteht bei Blutungen und operativen Eingriffen die Möglichkeit der Behandlung mit dem Vaso-pressinabkömmling DDAVP. Voraussetzung ist eine Restaktivität des F VIII:C, die durch DDAVP vervielfacht werden kann (77) (siehe auch unter Abschnitt 1.2.1). Über die Verbesserung gerinnungsphysiologischer Parameter - nicht des F VIII:C - bei

- 10 -

schwerer Hämophilie A durch DDAVP wurde berichtet (78), jedoch ist nicht gesichert, ob sich hier auch klinische Erfolge erzielen lassen.

Fast alle Hämophilen weisen chronische Erhöhungen der Transaminasen auf. Eine klinische oder subklinische Hepatopathie ist derzeit eine unvermeidbare Folge der Substitutionsbehandlung, da bislang keine Möglichkeit existierte⁺, eine Kontamination der Substitutionsmittel mit dem auslösenden Agens der Hepatitis B oder einer Non-A-Non-B-Hepatitis auszuschließen oder zu verhindern. Besondere Beachtung sollte der Tatsache zukommen, daß in einer Studie bei allen untersuchten Hämophilen histologisch Leberveränderungen nachzuweisen waren. Bei 36% der leberbiopsierten Patienten fand sich histopathologisch eine chronisch aktive Hepatitis (79).

1.3.2 Die Struktur von Faktor IX und die Hämophilie B

Die Isolierung von Faktor IX aus humanem und bovinem Plasma ist von mehreren Autoren beschrieben worden. SUOMELA (80) gibt je nach verwendeter Bestimmungsmethode für menschlichen Faktor IX ein Molekulargewicht von 66 000 bis 72 000 an. Humaner Faktor IX ist ein Glykoprotein, das 17,5% Kohlenhydrate enthält.

FUJIKAWA et al. (81) ermittelten für Rinder-Faktor IX ein Molekulargewicht von 55 400. Sie fanden einen etwas höheren Zucker-

⁺ Seit 1981 ist auch ein hepatitissicheres Faktor VIII-Konzentrat der Firma Behringwerke AG im Handel

anteil als SUOMELA für seine humane Präparation. Die molekularen Veränderungen von bovinem und auch von humanem Faktor IX durch die aktivierende Einwirkung von Faktor XIa sind bekannt (82,15).

Der dadurch entstehende Faktor IXa ist eine Serinprotease mit einem aktiven Serinrest in seiner schweren Kette. Die Region des aktiven Serinrestes weist eine beträchtliche Homologie der Aminosäuresequenz mit den Faktoren XIa, XIIa, VIIa, Xa und Thrombin (IIa) auf (33).

Die Hämophilie B

Bei der Hämophilie B liegt ein Faktor IX-Defekt vor, der wie bei der Hämophilie A, zur mangelhaften Funktion des Faktor X-Aktivatoren führt.

Immunologische Bestimmungen des Faktor IX-Antigens (F IX:AG) mit einem heterologen Antikörper zeigen bei 50% der Patienten ein Defektprotein an. Es besteht nicht immer eine unmittelbare Beziehung der Gerinnungsaktivität (F IX:C) zur Konzentration des F IX:AG (83). Durch Vergrößerung der Empfindlichkeit des verwendeten LAURELL-Immuno-Assays mittels "Enzymverstärkung" lassen sich bei den meisten Hämophilie B-Fällen geringe Mengen eines Defektproteins nachweisen (84).

Bei der Hämophilie B liegt also eher eine Fehlbildung als eine völlig reprimierte Synthese des Faktor IX vor. Das Ausmaß der konformativen Abweichung des Defektproteins kann sich auch in der Menge des feststellbaren F IX:AG ausdrücken, da die Antigenbindungsstellen auf ein normales Faktor IX-Molekül ausgerichtet sind.

Klinisch weist die Hämophilie B die gleiche Symptomatik wie die Hämophilie A auf (85). Auch für die Therapie gelten ähnliche Grundsätze. Als Substitutionsmittel werden Prothrombinkomplex-Konzentrate (PPSB) aus Humanplasma verwendet. Durch die längere Halbwertszeit (ca. 20 h) ist eine Behandlung mit weniger Aufwand durchführbar.

1.4 Synthetische Faktor VIII-ähnliche Aktivitäten

Einige Autoren berichten über die Normalisierung der Gerinnungszeiten von Faktor VIII-Mangelplasma durch synthetische Verbindungen.

E. und K.N. VON KAULLA (86) konnten bei Zusatz von bestimmten fibrinolyseinduzierenden organischen Anionen zu Hämophilie A-Plasma eine Verkürzung der partiellen Thromboplastinzeiten erzielen, die mit Faktor VIII-Aktivitäten von 50% der Norm korrespondieren. Folgende Verbindungen erwiesen sich bei einer Konzentration von 8 mMol/l als wirksam: N-(2-Chlor-6-methylphenyl)-4-amino-thiophen-3-carbonsäure, 3-Cinnamyl-salicylsäure sowie Flufenaminsäure.

Da die fibrinolytische Wirkung der Verbindungen auf der Blockierung von Inhibitoren (Antiplasmin) beruht, nehmen die Autoren - im Sinne einer Inhibitor-Theorie der Hämophilie nach TOCANTINS (65) - als Ursache des aktivierenden Einflusses auf hämophile Plasmen ebenfalls eine Inhibitorblockierung an.

BARROW und GRAHAM (87,88) gewannen eine Faktor VIII-ähnliche Aktivität nach der Behandlung von Plasma oder gereinigtem Albumin mit Bernsteinsäureanhydrid. Diese Aktivität konnte auch aus dem Plasma oder Albumin von Hämophilie A-Patienten gewonnen werden.

Mittels Gelfiltration ließen sich zwei Fraktionen der Aktivität unterscheiden; eine davon erwies sich in allen Faktor VIII-Tests als wirksam. Bemerkenswert ist hier, daß eine Faktor VIII-Spezifität nachgewiesen wurde, da die erhaltenen Fraktionen die Gerinnungszeiten von Mangelplasmen der Faktoren V, IX, X und XII nicht verkürzen konnten.

Bernsteinsäureanhydrid ist eine acylierende Verbindung, die durch Reaktion mit ϵ -Aminogruppen von Proteinen in der Lage ist, deren Anteil an negativer Ladung zu vergrößern (89). GRAHAM und BARROW (89) gelangten nach anderen Theorien (87) schließlich zu dem Ergebnis, daß die erzielte Faktor VIII-Aktivität lediglich ein Ausdruck der erhöhten Anzahl von Carboxylgruppen an bestimmten Proteinen sei.

Nach diesem Theor.ieansatz konsequent wurde in der Arbeit (89) dann nachgewiesen, daß auch synthetische Polypeptide von Monoaminodicarbonsäuren eine Faktor VIII-ähnliche Aktivität besitzen. Die verwendeten Verbindungen waren Polyglutaminsäure und Polyasparaginsäure variablen Molekulargewichtes. Als Testsystem wurden Einphasen-Faktorentests mit humanem Mangelplasma gewählt.

Bei allen geprüften Verbindungen ergaben sich mit Hämophilie A-Plasmen Gerinnungszeiten, die Faktor VIII-Aktivitäten von bis zu 0,52 U/ml entsprachen. Die Gerinnungszeit von Hämophilie B-

Plasma wurde ebenfalls deutlich verkürzt. Es soll betont werden, daß im gleichen Testsystem jedoch keine Faktor V-, Faktor X-, Faktor XII- und Faktor VII-Aktivität meßbar war. Der genannte Ausgleich von Gerinnungsdefekten war nur zu erreichen, wenn die Mangelplasmen vorher mit Kaolin aktiviert worden waren und wenn der Testansatz Phospholipide enthielt.

Als bemerkenswerter weiterer Effekt der synthetischen Polypeptide muß die potenzierende Wirkung auf natürliche Faktor VIII-Aktivität genannt werden: Wird der Faktor VIII-Defekt von Faktor VIII-Mangelplasma mit Normalplasma oder Faktor VIII-Konzentrat kompensiert, so läßt sich der meßbare Effekt vervielfachen (ca. 5fach), wenn gleichzeitig Polyglutaminsäure im Testansatz vorhanden ist.

Die aufgeführten Ergebnisse stellen dar, daß zumindest ein Ersatz der Faktor VIII-Funktion unter bestimmten in vitro-Bedingungen durch synthetische Verbindungen möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wird der Ersatz der Faktor VIII- und Faktor IX-Funktion durch Protaminsulfat und Polylysin beschrieben. Beide Polypeptide sind im Gegensatz zu Polyglutaminsäure und Polyasparaginsäure positiv geladen.

Protamine sind natürlich vorkommende Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 1000 bis 5000, die durch Komplexbildung mit den polyanionischen Nukleinsäuren deren dichte Packung in den Spermazellen ermöglichen. Sie werden industriell in großen Mengen aus Fischspermien gewonnen. Der stark basische Charakter der

Protamine ist durch deren hohen Gehalt an Arginin bedingt. So enthält das Salmin (Protamin vom Lachs) bis zu 90% Arginin (90).

Im klinischen Bereich wird Protamin, als Sulfat oder Chlorid, zur Antagonisierung der Heparinwirkung verwendet (91).

2. Material und Methoden

2.1 Gerinnungstests

2.1.1 Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

Die partielle Thromboplastinzeit ist ein standardisiertes Verfahren zur Überprüfung vor allem des endogenen Gerinnungssystems. Eine Aktivierung der Startphase erfolgt entweder durch die Oberfläche suspendierten Kaolins oder durch Ellagsäure. Die Funktion der Plättchenlipide wird ersetzt durch einen entsprechenden definierten Zusatz an Phospholipiden. Die Methode basiert auf Arbeiten von LANGDELL et al. (93).

Verwendet wurden je nach Fragestellung ein PTT-Reagens mit Kaolin als Startphasenaktivator und einem Lipidextrakt aus Humanplazenten, oder ein Reagens mit Ellagsäure als Aktivator (94) und pflanzlichen Lipiden. (Beide Reagenzien von den Behringwerken, Marburg/Lahn)

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen. In einem Plastikröhrchen bei 37°C werden gemischt:

0,1 ml Normal- oder Mangelplasma

0,1 ml Zusatz (z.B. Puffer oder Protaminsulfatlösung)

0,1 ml PTT-Reagens

nach 3 Minuten Inkubation bei 37°C

0,1 ml 0,025 Mol/l CaCl_2 -Lösung

Der Eintritt der Gerinnung wurde durch einen Fibrintimer mit optischer Endpunktbestimmung ermittelt (Fa. Labor, Hamburg).

Ein Koagulometer nach SCHNITGER und GROSS (Fa. Amelung, Lemgo) wurde bei einem Teil der Versuche verwendet; es ergab mit dem Fibrintimer vergleichbare Werte.

Die Verwendung von 0,1 ml zusätzlichem Volumen bedeutet eine Abwandlung des ursprünglichen Testsystems. Dieses Volumen wird benötigt, damit die Wirkung von Zusätzen auf die PTT des Plasmas untersucht werden kann. Der Charakter des Testes ändert sich nur insofern, als eine geringe Verlängerung der Zeiten beobachtet wird.

2.1.2 Thromboplastinzeit nach QUICK

Bei der Thromboplastinzeit erfolgt der Start der Gerinnung über das exogene System, d.h. durch ein Gewebsthromboplastin in Verbindung mit Faktor VII.

Verwendet wurde ein kalziumhaltiges Humanthromboplastin der Behringwerke (Marburg/Lahn). Es enthält einen thromboplastischen Extrakt aus Humanplazenten sowie Kalzium-Ionen in einer Konzentration von 0,01 Mol/l. Dieses Thromboplastinreagens zeigt einen Mangel an Faktor VII empfindlich an und ist daher auch zur Faktor VII-Bestimmung geeignet. Die Methode wurde von QUICK (95) eingeführt.

Folgendes Pipettierschema in ein auf 37 °C erwärmtes Plastikröhrchen fand Anwendung:

0,1 ml Mangelplasma

0,1 ml Zusatz (z.B. Puffer oder Protaminsulfatlösung)

nach 30 sec Inkubation bei 37 °C

0,2 ml Kalziumthromboplastin-Lösung

Der Gerinnungseintritt wurde, wie bei 2.1.1 angegeben, bestimmt. Für die Bedeutung des zusätzlichen Volumens von 0,1 ml gilt dasselbe wie unter 2.1.1 erwähnt.

2.1.3 Faktoren-Tests

Das Prinzip der verwendeten Einphasen-Faktorentests besteht darin, daß ein Substratplasma, das einen hochgradigen Mangel des jeweils zu bestimmenden Faktors aufweist, in seinen Gerinnungszeiten durch Zusatz relativ geringer Mengen des Mangelfaktors normalisiert werden kann. Da ein Mangelplasma alle Gerinnungsfaktoren bis auf den Mangelfaktor im Überschuß enthält, hängt die Gerinnungszeit bei Zusatz von verdünnten Plasmaproben nur von deren Gehalt an dem Mangelfaktor ab.

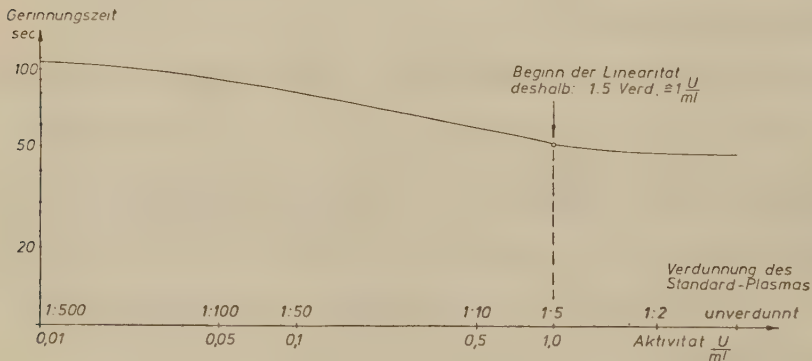


Abb. 4 Beispiel für die Eichkurve eines Gerinnungs-faktors im Einphasentestsystem. Dargestellt ist der Bezug von Gerinnungszeit und Faktoren-aktivität in doppelt-logarithmischem Maßstab [nach (96)]

So ist durch Korrektur von Mangelplasma durch variable Verdünnungen von Standard-Normalplasma das Aufstellen einer Eichkurve für den betreffenden Faktor möglich (siehe Abb. 4). Es erfolgt eine Zuordnung von Gerinnungszeiten zu den definierten Verdünnungen des Standard-Normalplasmas.

Die für die einzelnen Faktoren zu wählende Testmethode hängt von deren Stellung in der Gerinnungskaskade ab. So wurde ein auf der PTT basierender Test mit dem Kaolin enthaltenden Reagens (unter 2.1.1 beschrieben) für die Bestimmung der Faktoren VIII, IX, XI, XII und Fletcher-Faktor verwendet. Zur Messung der Faktoren II, X, V und VII fand das Kalziumthromboplastin (unter 2.1.2 beschrieben) Anwendung. Die Testdurchführung erfolgte für alle Mangelplasmen im einzelnen nach den Angaben der Behringwerke zu ihren Mangelplasmen [Zusammenfassung bei (96)] .

Zur Erstellung der Eichkurven wurde ein Standard-Normalplasma mit deklariertem Gehalt der einzelnen Faktoren verwendet (Behringwerke, Marburg/Lahn). Die Verdünnung des Standardplasmas und die Verdünnung aller Proben erfolgte mit Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer (DBA-Puffer), pH 7,6; 0,05 Mol/l.

Für die auf der PTT basierenden Tests fand folgendes Schema Anwendung:

Plastikröhrchen, 37°C

0,1 ml Mangelplasma

0,1 ml Standardplasmaverdünnung oder Probe

0,1 ml PTT-Reagens

nach 3 Minuten Inkubation bei 37°C

0,1 ml 0,025 Mol/l CaCl_2 -Lösung

Eine Inkubationsdauer von 3 min statt 6 min laut Herstellerangaben wurde als ausreichend befunden und stimmt mit den Empfehlungen von VINAZZER (97) überein.

Zur Erstellung der Eichkurven erfolgte eine Verdünnung des Standardplasmas in drei Schritten: 1:5, 1:50 und 1:500. Unter der Voraussetzung, daß die zu bestimmende Probe ebenfalls 1:5 verdünnt wird und das Standardplasma eine Aktivität des betreffenden Faktors von 1 U/ml aufweist, entspricht die Gerinnungszeit des Standards für die 1:5-Verdünnung dann einer Aktivität von 1 U/ml, für die 1:50-Verdünnung bzw. für die 1:500-Verdünnung einer Aktivität von 0,1 U/ml bzw. 0,01 U/ml. Ein Pufferwert wurde ebenfalls bestimmt.

Das Schema für die auf der Thromboplastinzeit basierenden Tests war folgendes:

Plastikröhrchen, 37°C

0,1 ml Mangelplasma

0,1 ml Standardplasmaverdünnung oder Probe

nach 30 sec Inkubation bei 37°C

0,2 ml Kalziumthromboplastin-Lösung von 37°C

Die Erstellung der Eichkurven erfolgte mit Verdünnungen des Standardplasmas in den Stufen 1:20, 1:200 und 1:2000. Die zu testenden Proben sind 1:20 verdünnt worden. Es steht jetzt die Gerinnungszeit der 1:20-Standardplasma-Verdünnung, wenn die Aktivität des Standardplasmas für den Faktor 1 U/ml ist, für eine Gerinnungsaktivität von 1 U/ml. Pufferleerwerte wurden für jedes Mangelplasma bestimmt.

Beim Auftragen der Gerinnungszeiten gegen die Standardplasma-verdünnungen auf doppelt-logarithmisches Papier ergibt sich für den Bereich von 0,1 U/ml bis 1 U/ml eine Gerade, die bei niedrigen Aktivitäten geringfügig flacher verläuft (siehe Abb. 4).

Für jede benutzte Charge eines bestimmten Mangelplasmas wurde in der zuvor angegebenen Weise eine Bezugskurve erstellt, deren Gültigkeit von Tag zu Tag anhand eines Standards überprüft wurde.

Das Pipettierschema und die Inkubationszeiten der Faktorenbestimmungen entsprechen der Anordnung bei der Bestimmung der PTT und der Thromboplastinzeit. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, einer Verkürzung der PTT oder der Thromboplastinzeit eines Mangelplasmas, die durch andere Einflüsse als den Ersatz des Mangelfaktors bedingt ist, zu Vergleichszwecken eine entsprechende Faktorenaktivität zuzuordnen.

Bei allen genannten Tests hängt die erzielbare Genauigkeit von der exakten Bestimmung des Gerinnungseintrittes ab. Alle Bestimmungen wurden deshalb mindestens zweifach ausgeführt. Die Abweichungen der Mehrfachbestimmungen betrugen nicht mehr als eine Sekunde bei Werten unter 100 sec, bei Zeiten darüber nicht mehr als zwei Sekunden. In den Tabellen erscheint jeweils der arithmetische Mittelwert der Mehrfachbestimmungen.

2.1.4 Verwendete Plasmen, Antiseren und Substanzen

Die verwendeten Mangelplasmen waren kommerziell erhältliche, lyophilisierte humane Mangelplasmen mit Restaktivitäten der

jeweiligen Mangelfaktoren von unter 1% ($<0,01$ U/ml).

Es wurden Mangelplasmen der Faktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI der Behringwerke (Marburg/Lahn) verwendet und auch Mangelplasmen der Faktoren V, VII, VIII, IX, X, XI und XII der Fa. Immuno (Heidelberg). Ein Fletcher-Faktor-Mangelplasma, das noch nicht im Handel war, wurde freundlicherweise von den Behringwerken in tiefgefrohrenem Zustand zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurde ein Großteil der Versuche mit dem Plasma eines Patienten mit schwerer Hämophilie A durchgeführt, das auf die übliche Weise (10% Volumenanteil 0,11 Mol/l Na-Citrat, 15 min zentrifugiert bei $1500 \times g$) gewonnen und in Portionen zu einem Milliliter eingefroren wurde. Gelagert wurde das Plasma bei minus 30°C für höchstens zwei Monate.

Die Versuche und die Lagerung von Plasmen erfolgten ausschließlich in Kunststoffröhrchen.

Wurde zu Vergleichen ein Normalplasma benötigt, fand das Standard-Humanplasma der Behringwerke Anwendung.

Zur Bereitung von künstlichen Mangelplasmen wurden die Antiseren gegen humanen Faktor IX und Faktor VII der Behringwerke verwendet.

Das benutzte Protaminsulfat war das Salmin Grade I der Fa. Sigma (München); das Poly-L-Lysin (MG 5000-10 000) wurde von der Fa. Serva (Heidelberg) bezogen. In zusätzlichen Stichproben wurden auch noch das Salmin Grade II und X der Fa. Sigma (München) und ein Protaminsulfat zur klinischen Anwendung von der Fa. Novo (Mainz) verwendet.

2.2 Immunologischer Nachweis von Gerinnungsfaktoren

2.2.1 Quantitative Immunelektrophorese nach LAURELL

Bei der Elektro-Immuno-Diffusion nach LAURELL (98) läßt man ein zu bestimmendes Antigen in einem antikörperhaltigen Agarose-Gel elektrophoretisch wandern. Es bilden sich "Raketen-förmige" Präzipitate, die angefärbt werden können. Die Höhe der Präzipitate ist der Antigenkonzentration proportional.

Als Antiseren für die Bestimmung des Faktor VIII-assoziierten Proteins (F VIIIR:AG) und des Faktor IX-Antigens (F IX:AG) dienten die käuflichen Antiseren der Behringwerke (Marburg/Lahn). Die Bestimmungen wurden nach den Angaben der Behringwerke zu deren Antisèren durchgeführt.

Eine 10cm x 10cm große Glasplatte wurde mit einem 1%igen Agarose-Gel beschichtet. Die Antiserumkonzentration war für die Bestimmung des F VIIIR:AG 0,4% (V/V), für die Bestimmung des F IX:AG 0,5% (V/V).

Die Elektrophoresen erfolgten in einer Multiphor-Elektrophoresekammer der Fa. LKB (Bromma, Schweden) unter ständiger Kühlung der Glasplatten auf 12°C mit dem Umlaufthermostat. Als Elektrophoresepuffer diente ein Barbiturat-Puffer pH 8,6 mit der Ionenstärke $\mu = 0,02$. Die Feldstärke betrug 2 V/cm bei einer Laufzeit von 16 Stunden. Das Auftragsvolumen für die F VIIIR:AG-Probe war 5 μ l, für das F IX:AG 15 μ l.

Für die Eichung wurde ein lyophilisiertes Standardplasma der Fa. Kabi (Stockholm) verwendet, das aus einem Plasma-Pool von mindestens 10 gesunden Spendern gewonnen wird.

Eingesetzt wurde das Standardplasma in den Verdünnungen 1:8, 1:4, 1:2 und unverdünnt.

2.2.2 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die Methode wurde von CLARKE und FREEMAN (99) zu der heute verwendeten Technik ausgebaut.

Es erfolgt eine Auftrennung eines Proteingemisches (z.B. Plasma) zunächst in einem antikörperfreien Agarose-Gel. Anschließend wird die elektrophoretische Wanderungsrichtung um 90° zur ursprünglichen Richtung verändert und es erfolgt nunmehr eine Einwanderung der bereits aufgetrennten Plasmaproteine in ein antikörperhaltiges Gel. In diesem Gel werden die Proteine dann sichtbar durch Immunpräzipitatbildung.

Diese Methode erlaubt die Untersuchung des elektrophoretischen Verhaltens einzelner - auch sehr gering konzentrierter - Proteine eines Proteingemisches und auch eine quantitative Auswertung.

Für die erste Dimension wurde zunächst eine Plasmaprobe von 10 µl in einem 1%igen Gel mit einer Feldstärke von 10 V/cm in einer Zeit von 75 Minuten aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung eines 1 cm breiten und 6 cm langen Gelstreifens an den Rand einer 8cm x 10cm großen Glasplatte. Dieser Gelstreifen wurde mit einem ebenfalls 1%igen Agarose-Gel umgossen, das zwei Antisera, Anti-F VIII:R:AG (0,4% V/V) und Anti-F IX:AG (0,5% V/V) enthielt. Die Wanderung in der zweiten Dimension wurde bewirkt durch die elektrische Feldstärke von 2 V/cm bei einer Dauer von 16 Stunden.

Die Elektrophoresen wurden in der gleichen Apparatur und im gleichen Puffer wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Präzipitate wurden, genau wie bei 2.2.1, mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Fa. Serva, Heidelberg) angefärbt.

2.3 Herstellung von Protamin-Sepharose

Durch Immobilisierung bestimmter Moleküle an einem hochmolekularen Polysaccharidträger ist es möglich, das Affinitätsverhalten von z.B. verschiedenen Proteinen zu dem immobilisierten Molekül zu ermitteln. Das Prinzip der Methode stammt von AXEN et al. (100).

In diesem Fall wurde Protamin an Sepharose 4B gekoppelt. Die Kopplung erfolgte nach den Angaben von PIEPKORN et al. (101) jedoch mit einigen Modifikationen. Für die Präparation von Protamin-Sepharose wurde 250 ml Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) gequellt in destilliertem Wasser, mit 0,2 Mol/l NaCO_3 äquilibriert. Die so behandelte Sepharose wurde sodann in 500 ml 0,2 Mol/l NaCO_3 suspendiert; hinzugefügt wurden 10 g Cyanbromid in 10 ml Dimethylformamid. Die Temperatur dieses Aktivierungsgemisches wurde durch Zugabe von Eisstückchen aus destilliertem Wasser im Bereich von 15 °C bis 20 °C gehalten, der pH-Wert annähernd auf 11 durch tropfenweises Hinzufügen von 12 Mol/l Natriumhydroxidlösung. Nach 10 Minuten wurde das Gel in einem Büchner-Trichter mit 2500 ml kaltem (4 °C) 0,15 Mol/l Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 und mit einem Liter kaltem destilliertem Wasser gewaschen.

Nach diesem Aktivierungsschritt der Sepharose erfolgte die

Zugabe von 250 ml einer 1%igen (W/V) Protaminsulfatlösung (Salmin Grade I, Fa. Sigma, München) in 0,2 Mol/l NaCO_3 . Dieses Kopp-
lungsgemisch, justiert auf einen pH-Wert von 8,2 mittels 1 Mol/l
Natrium-Hydroxid-Lösung, wurde 2 1/2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Blocken evtl. vorhandener aktiver Gruppen, die nicht durch Protamin abgesättigt waren, wurde die Protamin-Sepharose 16 Stunden lang einer 1 Mol/l Äthanolaminlösung bei pH 8 und 4°C ausgesetzt.

Das Endprodukt wurde zunächst mit 5 Litern destilliertem Wasser, dann alternierend mit je 2 Litern 1 Mol/l NaCl in 0,1 Mol/l Phosphat-Puffer pH 8,6 und 4,2 gewaschen. Die endgültige Äquilibrierung der Protamin-Sepharose erfolgte mit Tris-HCl-Puffer 0,05 Mol/l pH 7,4, enthaltend 0,1 Mol/l NaCl. Aufbewahrt wurde das Gel mit einem Zusatz von 0,02% Natrium-Azid bei einer Temperatur von 4°C.

Vor jedem Einsatz eines Teils der Protamin-Sepharose für Experimentierzwecke wurde dieser dreimal mit einem großen Überschuß des Gelvolumens an Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gewaschen.

Es soll besonders betont werden, daß wegen der starken Toxizität des Cyanbromids alle Arbeiten mit großer Sorgfalt, unter Verwendung von Einmalhandschuhen, unter dem Abzug durchgeführt wurden.

2.4 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Zum Nachweis von Protein in Lösung fand das Reagens der Fa. Bio-Rad Laboratorien (München) Anwendung, das sich auf Arbeiten von BRADFORD (102) gründet. Prinzipiell basiert die Methode auf der

Beobachtung, daß das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 sich von 465 nm auf 595 nm verändert, wenn der Farbstoff an ein Protein gebunden wird. Die Sensitivität der Methode ist mit 1 µg hoch, jedoch läßt sich nicht für jedes Protein in gleicher Weise eine lineare Eichkurve erstellen.

Zur Bestimmung wurde zunächst die Stammlösung 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend filtriert. Ein Milliliter dieser Lösung wurde zusammen mit 100 µl der Probe in eine Mikroküvette aus Kunststoff pipettiert und nach 5 minütigem Warten die Extinktion bei 595 nm in einem Doppelkanal-Photometer, Typ UV 200 der Fa. Shimadzu (Kyoto, Japan), gegen eine Küvette mit einem Milliliter Reagens und 100 µl Puffer bestimmt.

2.5 Photometrische Bestimmung von Heparin im Plasma mittels chromogenen Substrates

Die Methode der Bestimmung wurde ausgearbeitet von TEIEN und LIE (103).

Das Prinzip besteht darin, die amidolytische Aktivität von gereinigtem Faktor Xa gegenüber dem synthetischen Peptidsubstrat S-2222 durch den Heparin-Antithrombin-III-Komplex zu hemmen. Durch Zusatz von gereinigtem Antithrombin III (AT III) wird die AT III-Konzentration des Ansatzes konstant und unabhängig vom AT III-Gehalt des untersuchten Plasmas gehalten, so daß der Umsatz an S-2222 nur von der Heparinkonzentration der Plasmaprobe abhängt.

Zur Testdurchführung wurde der Heparin-Kit der Fa. Kabi (Stockholm) verwendet, der aus diesen Reagenzien besteht:

- Peptidsubstrat S-2222 1 mMol/l
- Faktor Xa, mit einer enzymatischen Aktivität von 7 nKat/ml gegenüber dem Substrat S-2222
- Antithrombin III (AT III) 1 U/ml
- Tris-Puffer 0,05 Mol/l mit EDTA 7,5 mMol/l, pH 8,4
- Standard-Normalplasma aus einem Pool von mindestens 10 Spendern

Das Heparin für die Bezugskurve war das Heparin Grade II mit einer spezifischen Aktivität von 151 U/ml (wasserfrei) der Fa. Sigma (München). Für den Test wurde hieraus eine Standard-Heparinlösung mit 0,2 U/ml durch Verdünnen mit o.g. Tris-Puffer pH 8,4 hergestellt.

Zur Aufstellung der Eichkurve erfolgte die Mischung von einem konstanten Volumen Standard-Normalplasma und AT III mit einer steigenden Menge an Heparin nach folgendem Schema:

Heparin- Standards U/ml Plasma	Puffer μ l	AT III- Lösung μ l	Standard- Normal- plasma μ l	Heparin- lösung μ l
I 0	800	100	100	0
II 0,2	700	100	100	100
III 0,4	600	100	100	200
IV 0,6	500	100	100	300
V 0,8	400	100	100	400

Die Verdünnung der zu testenden Proben erfolgte analog zur Lösung I der Standards.

Bei der Testdurchführung wurde die Endpunktmethode verwendet, bei der durch Ansäuern des Reaktionsgemisches nach festgelegter Reaktionszeit die enzymatische Aktion des Faktors Xa gestoppt wird. Die Menge des bis dahin abgespaltenen p-Nitroanilins bleibt dann für 4 Stunden konstant und wird bei 405 nm photometrisch bestimmt. Sie ist umgekehrt proportional zur Heparinkonzentration.

Das verwendete Photometer war der Typ UV 200 der Fa. Shimadzu (Kyoto, Japan).

Die Aufbereitung der Proben und Standards erfolgte nach dieser Anordnung:

Arbeitsfolge ↓	Meß- Küvette	Referenz- Küvette
Probe oder Standard µl	200	200
Inkub. f. 3-4min b. 37°C	X	---
Faktor Xa (ca. 21°C) µl	100	---
Mischen u. Inkubieren sec	30	---
Substrat S-2222 (37°C) µl	200	---
Mischen u. Inkubieren sec	180	---
Essigsäure 50%ig µl	300	300
Sofort mischen	X	X
Aqua dest. µl	---	300
Mischen	---	X

3. Ergebnisse

3.1 Einleitende Charakterisierung der PTT-Korrektur von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma durch Protaminsulfat

3.1.1 Fragestellung

Beim Testen heparinhaltiger Proben auf ihren Faktor VIII-Gehalt war es erforderlich, vorher die Wirkung des Heparins durch Protaminsulfat zu neutralisieren. Anlässlich dieser Messungen wurde beobachtet, daß eine Normalisierung der Gerinnungszeiten nur durch Zugabe von Protaminsulfat zum Mangelplasma zu erreichen ist.

Es erschien lohnend, diesen Effekt näher zu untersuchen.

Zunächst sollte festgestellt werden, bei welcher Konzentration an Protaminsulfat das Optimum der PTT-Verkürzung liegt. Weiterhin erschien es sinnvoll, wegen der engen physiologischen Beziehung der Faktoren VIII und IX, auch die Protaminsulfatwirkung auf Faktor IX-Mangelplasma zu untersuchen. Zu Vergleichszwecken und zur Aufdeckung evtl. vorhandener unspezifischer Effekte wurde auch Normalplasma in gleicher Weise getestet.

Es sollte auch geklärt werden, ob im Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma eine echte Faktorenaktivität erzeugt wird, oder ob andere Mechanismen für die Erklärung der PTT-Verkürzung durch Protaminsulfat in Betracht kommen müssen.

Schließlich ging es um die Frage von gemeinsamen Wirkungen von Normalplasma und Protaminsulfat auf Faktor VIII-Mangelplasma.

3.1.2 Versuchsbeschreibung

Um das Wirkungsoptimum des Protaminsulfates festzustellen, wurde die PTT wie unter 2.1.1 beschrieben eingesetzt. Protaminsulfatlösungen in einer geometrischen Verdünnungsreihe in Konzentrationen von 12,5 µg/ml bis 400 µg/ml wurden hergestellt.

Jeweils 0,1 ml dieser Lösungen (Abszisse von Abb. 5) dienten als Zusatz zum Testsystem.

Zur Überprüfung einer Generation von Faktor VIII- und Faktor IX-Aktivität fand das Einphasen-Faktorentestsystem, wie unter 2.1.3 aufgeführt, Anwendung. Auf die Analogie zum PTT-Testsystem wurde an derselben Stelle bereits hingewiesen.

Es wurden je 2 ml Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma durch Zusatz von je 20 µl Protaminsulfatlösung auf eine Protaminsulfatkonzentration von 100 µg/ml gebracht und anschließend im thermostatisierten Wasserbad bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen, 1:5 verdünnt mit DBA-Puffer und mit einem anderen Mangelplasma auf die jeweilige Gerinnungsaktivität getestet. Zur besseren Veranschaulichung hier die Testanordnung in tabellarischer Form:

im Plastikröhrchen bei 37°C

0,1 ml Substrat-Mangelplasma

0,1 ml 1:5 verdünntes, Protaminsulfat enthaltendes Faktor VIII-
oder Faktor IX-Mangelplasma oder 1:5 verdünntes
Standard-Normalplasma

0,1 ml PTT-Reagens

nach 3 min Inkubation bei 37°C

0,1 ml 0,025 Mol/l CaCl_2 -Lösung

Zur Kontrolle des Testsystems wurde während des gesamten Zeitablaufs auch ein Zusatz von 1:5 verdünntem Standard-Normalplasma zu beiden Substrat-Mangelplasmen geprüft.

Um die gegenseitige Beeinflussung von Normalplasma-Korrektur und Korrektur des Testsystems für Faktor VIII nach 2.1.3 durch Protaminsulfat feststellen zu können, wurde zunächst die Gerinnungszeit, die im mittleren Bereich der Eichkurve liegen sollte, nach Zusatz von 1:10 verdünntem Normalplasma bestimmt; anschließend die Gerinnungszeiten von Zusätzen drei verschiedener Protaminsulfatkonzentrationen und deren zugeordnete Faktor VIII-Aktivitäten. Als eigentlicher Versuch erfolgte dann die Testung der drei Protaminsulfatkonzentrationen mit jeweils einem Normalplasmaanteil, der einer 1:10-Verdünnung entsprach.

3.1.3 Ergebnisse und Diskussion

Wie durch Abb. 5 dargestellt, ergibt sich für das Faktor VIII-Mangelplasma wie auch für das Faktor IX-Mangelplasma ab einer Protaminsulfatkonzentration des Zusatzes von 25 µg/ml eine deutliche Verkürzung der PTT. Das Optimum für das Faktor VIII-Mangelplasma liegt bei 100 µg/ml, für das Faktor IX-Mangelplasma bei 50 µg/ml. Jenseits dieses Optimums wird eine Gerinnungshemmung bewirkt, die bei Protaminsulfatkonzentrationen oberhalb von 300 µg/ml die Probe nicht mehr innerhalb von 500 sec gerinnen läßt.

Bemerkenswert ist, daß das Standard-Normalplasma in seinen Gerinnungszeiten bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml nicht

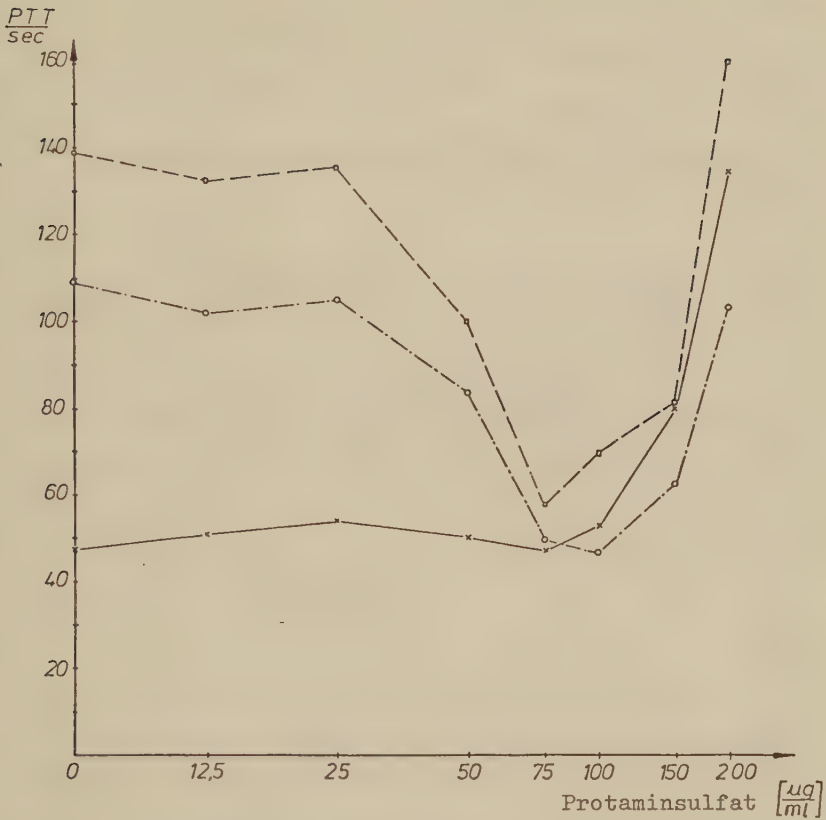


Abb. 5 Wirkungen verschiedener Konzentrationen an Protaminsulfat auf F VIII- und F IX-Mangelplasma

- x— Standard-Normalplasma
- o-o- F VIII-Mangelplasma
- o-o- F IX-Mangelplasma

Bei Konzentrationen oberhalb von 300 $\mu\text{g/ml}$ ließ sich bei keinem der Plasmen innerhalb von 500 sec eine Gerinnung erzielen

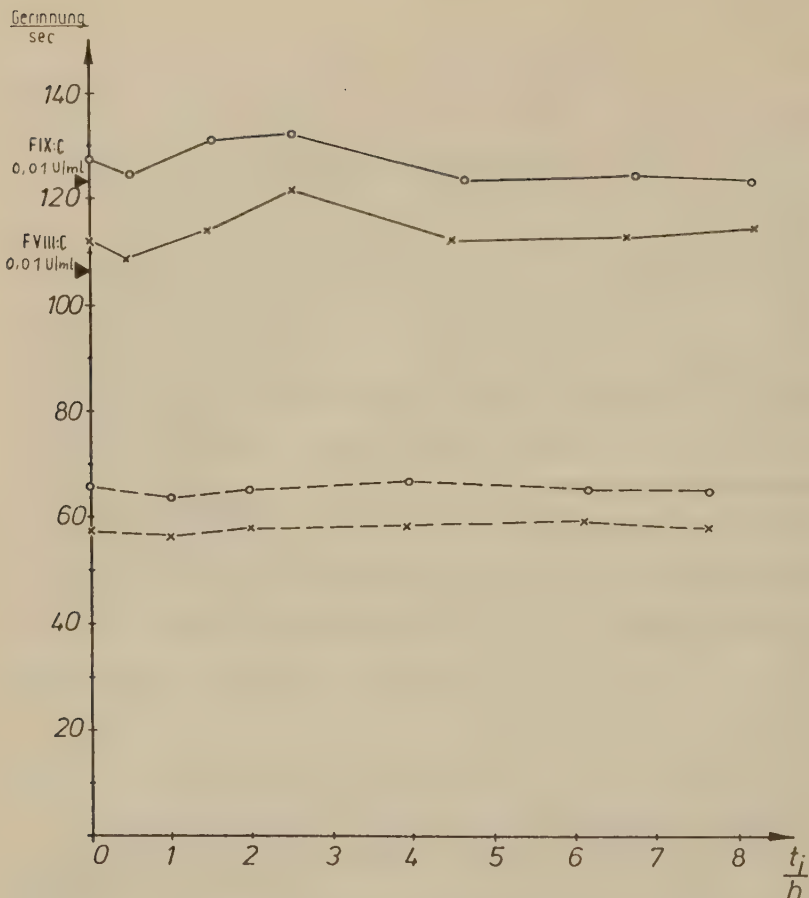


Abb. 6 Darstellung, daß durch Protaminsulfat keine F VIII- oder F IX-Aktivität erzeugt wird

Erklärung der Abkürzungen siehe bei Tab. 1
 t_i : Inkubationszeit bei 37°C

x—x F VIII-Mangelpl. incl. 0,1 mg/ml Prot.Sulf.,
 inkubiert bei 37°C, 1:5 verdünnt und mit
 anderem F VIII-Mangelpl. auf Aktivität getestet

o—o F IX-Mangelpl. incl. 0,1 mg/ml Prot.Sulf.,
 inkubiert bei 37°C, 1:5 verd. und mit anderem
 F IX-Mangelpl. auf Aktivität getestet

x---x Kontrolle F VIII-Test mit St.Pl. 1:5 verd.

o---o Kontrolle F IX-Test mit St.Pl. 1:5 verd.

deutlich beeinflußt wird, während der Eintritt des Hemmungseffektes sich mit dem des Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasmas vergleichen läßt.

Zur Gerinnungshemmung des Protaminsulfates siehe auch unter 3.7.3 und 3.5.2.3 .

Das Faktor VIII-Mangelplasma zeigt beim Wirkungsoptimum nahezu dieselbe Gerinnungszeit wie Normalplasma. Das trifft für das Faktor IX-Mangelplasma nicht ganz zu; jedoch zeigt sich schon in der Differenz von 30 sec des Pufferleerwertes zum Faktor VIII-Mangelplasma die diesem Faktor IX-Mangelplasma eigene Gerinnungsverzögerung. Das könnte auch die Differenz der Zeiten beim Protaminsulfatoptimum erklären. (Siehe hierzu auch Abb. 6 : Kontrolle F IX-Test mit St.Pl.)

In Abb. 6 sind die Gerinnungszeiten des Faktor VIII- und Faktor IX-Testsystems aufgeführt, das in bestimmten Zeitabständen durch Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasmen, die Protaminsulfat in der vorher ermittelten optimalen Korrekturkonzentration enthielten, auf eine Aktivitätsentwicklung hin überprüft wurde.

Die Zeiten, die gemäß den Eichkurven einer Aktivität von 0,01 U/ml entsprechen, sind auf der Ordinate für den jeweiligen Faktor durch Pfeile gekennzeichnet.

Es zeigt sich über die gesamte Inkubationsperiode von acht Stunden weder eine für Faktor VIII noch eine für Faktor IX spezifische Aktivitätsentwicklung. Das Substratmangelplasma des Testsystems läßt sich jedoch bei beiden Faktoren durch eine

Zusatz zu F VIII Mangelpl.	$\frac{\text{PTT}}{\text{sec}}$	Aktivität des Zusatzes U/ml
Prot.Sulf. 0,25 mg/ml	252	0 Hemmung
Prot.Sulf. 0,1 mg/ml	47,5	0,52
Prot.Sulf. 0,05 mg/ml	60,4	0,07
St.Pl. 1:10	59,1	0,08
Prot.Sulf. 0,25 mg/ml +St.Pl.1:10	207	0 Hemmung
Prot.Sulf. 0,1 mg/ml +St.Pl.1:10	43,3	>1,0
Prot.Sulf. 0,05 mg/ml +St.Pl.1:10	48,8	0,4

Tab. 1 Gemeinsame Effekte von Normalplasma
und Protaminsulfat auf Faktor VIII-
Mangelplasma

St.Pl. : Standard-Normalplasma

Prot.Sulf. : Protaminsulfat

Das Volumen des Testansatzes war stets
0,4 ml

1:5-Verdünnung von Normalplasma während der gesamten Inkubationsperiode korrigieren. Das zeigt die Zuverlässigkeit des Testes im Zeitverlauf des Versuches an.

Das negative Ergebnis im Faktor VIII- und Faktor IX-Test bedeutet darüberhinaus auch, daß durch Protaminsulfat keine irreversible (evtl. konformative) Änderung eines Plasmaproteins erfolgt, das dann seinerseits auch nach Verdünnung des Plasmas stellvertretend für die Faktor VIII- oder Faktor IX-Aktivität den jeweiligen Test beeinflussen könnte. Vielmehr kann gefolgert werden, daß eine bestimmte Konzentration an Protaminsulfat im Gesamtestsyst^{em} für eine Normalisierung der Gerinnungszeiten vonnöten ist. Durch die 1:5-Verdünnung des mit Protaminsulfat versetzten Mangelplasmas wird auch die Konzentration an Protaminsulfat im Gesamtestsyst^{em} auf 1/5 herabgesetzt. Wie in Abb. 5 zu sehen, ergibt sich bei dieser Konzentration noch keine auffällige gerinnungsfördernde Wirkung.

Die Durchführung des Testes unterscheidet sich von der bei Abb. 3 nur durch die Zugabe von 1/5 Volumen Mangelplasmaanteil und durch die Anreicherung mit einem geringen Volumen konzentrierter Protaminsulfatlösung direkt zum Mangelplasma. Daß dieses Verfahren ebenso gut wie das bei Abb. 5 zur Korrektur der Mangelplasmen führt, zeigt sich in der Anordnung von 3.4.1.3, Abb. 8.

Tabelle 1 ist dahingehend zu erläutern, daß die PTT von 252 sec durch den inhibitorischen Zusatz von 250 µg/ml Protaminsulfat zu dem Faktor VIII-Testsystem bei Anwesenheit von 1/10 Volumenanteil Normalplasma im Zusatz auf 207 sec verkürzt wird.

Die Minderung der Protaminsulfathemmung ließe sich durch die

gerinnungsfördernde Wirkung des Normalplasmazusatzes wie auch durch das Bindungsvermögen seiner Plasmaproteine für das Protaminsulfat erklären.

Die korrigierende Wirkung der Protaminsulfatkonzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ wird durch die gleichzeitige Präsenz des Normalplasmas noch erheblich verstärkt. Und zwar ergibt sich eine Verbesserung der tatsächlichen bzw. der zugeordneten Aktivitäten, die über die arithmetische Summe der Einzelaktivitäten weit hinausgeht. Für die Korrektur mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Normalplasma wäre ein additives Verhalten zu erwarten gewesen, wie sich aus der Erstellung jeder Faktoreneichkurve ergibt.

3.2 Die Wirkung von Protaminsulfat und Polylysin auf verschiedene Mangelplasmen

3.2.1 Fragestellung

Nachdem festgestellt war, daß Protaminsulfat sowohl in Plasmen, die keine Faktor VIII-Aktivität als auch in solchen, die keine Faktor IX-Aktivität aufweisen, im Sinne einer Gerinnungsverkürzung wirksam ist, lag es nahe zu untersuchen, welche Gerinnungsfaktoren für den Effekt im Plasma vorhanden sein müssen. Das ist auf einfache Weise dadurch möglich, daß Plasmen verwendet werden, denen die Aktivität jeweils eines Faktors fehlt.

Weiterhin bietet es sich an zu prüfen, ob durch Protaminsulfat nicht ein Kurzschluß der ersten Aktivierungsphase des intrinsischen Systems bewirkt wird, also der Angriff erst an Faktoren erfolgt, die in der Gerinnungskaskade unterhalb der Faktoren VIII und IX stehen.

Zu erwähnen sind hier die frühen Ergebnisse von FERGUSON (104), der eine beschleunigte Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin in Gegenwart von Protaminsulfat beschreibt. Auch eine direkte Präzipitation von Fibrinogen durch Protaminsulfat ist bekannt (105). Allerdings sind die dazu erforderlichen Konzentrationen mit 1,6 mg/ml für das Optimum der beschleunigten Umwandlung von Fibrinogen durch Thrombin und mit 9 mg/ml für die komplette Präzipitation von Fibrinogen im Plasma erheblich höher als für die hier beschriebene Korrektur der Mangelplasmen.

Beachtenswert in diesem Zusammenhang ist auch der Befund von

LANDABURU und SEEGER (106) über eine autokatalytische Konvertierung von gereinigtem Prothrombin zu Thrombin durch Protaminsulfat. Dieser Effekt wurde indessen nur für Protaminsulfatkonzentrationen von 3,3 mg/ml beschrieben und benötigte zur deutlichen Ausprägung mehrere Stunden.

3.2.2 Versuchsbeschreibung

Verwendet wurden die Testsysteme für die PTT nach 2.1.1 und die Thromboplastinzeit nach 2.1.2. Die untersuchten Plasmen sind aus den Tabellen 2 und 3 zu ersehen. Für die Faktoren II, X und V wurden sowohl die Bestimmungen basierend auf der PTT als auch auf der Thromboplastinzeit verwendet, da für diese Faktoren beide Aktivierungswege möglich sind und deren Einfluß auf den Protaminsulfateffekt so festgestellt werden könnte.

Wie durch die Ergebnisse mit Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma gezeigt, wurde als Zusatz zum Testsystem die wirksame Protaminsulfatkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

Zu Vergleichen und zur Zuordnung jeder Gerinnungszeit eines Mangelplasmas mit Protaminsulfatzusatz zu einer bestimmten Faktorenaktivität wurde nach 2.1.3 für jedes Mangelplasma eine Eichkurve erstellt. Es sind davon aufgeführt in Tab. 2 und 3 die Zeiten für die 1:5 bzw. 1:20 Verdünnung sowie für die 1:50 bzw. 1:200 Verdünnungen des Standard-Normalplasmas. Ein Pufferleerwert wurde ebenfalls erstellt.

Die Mangelplasmen, die sich mittels Protaminsulfat aktivierend beeinflussen ließen, wurden auch mit Poly-L-Lysin geprüft, einem Polykation wie Protamin.

Zusatz gleiches Volumen wie Mangelplasma	Mangelplasmen					Fletcher- Faktor
	F II ■	F II ●	F X ■	F X ●	F VII ■	
Protaminsulfat	>300	>300	>300	140,3	>300	265
0,1 mg/ml	0	<0,001	0	0	0	U/ml ▲
1:5 oder 1:20 verdünntes Standard-Normalpl.	28,7	58,5	29,9	63,0	30,6	52,0
	0,045	0,18	0,048	0,19	0,045	U/ml ▲
1:50 oder 1:200 verdünntes Standard-Normalpl.	75,1	190,4	53,7	88,2	54,6	82,5
	0,0045	0,018	0,0048	0,019	0,0045	U/ml ▲
Puffer	231,6	>300	65,5	124,3	76,6	183
	0	0	0	0	0	U/ml ▲

Tab. 2 Der Einfluß von Protaminsulfat auf die Gerinnung verschiedener Mangelplasmen

- Einphasentest basierend auf der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)
- Einphasentest basierend auf der Thromboplastinzeit (Quick)
- ▲ Gerinnungsaktivität des Zusatzes in Einheiten pro Milliliter

Zusatz Gleiches Volumen wie Mangelplasma	Mangelplasmen					
	F IX •	F VIII •	F V ■	F V •	F XI •	F XII •
Protaminsulfat	56,0	47,4	> 300	194,2	93,4	> 500
0,1 mg/ml	0,4	0,56	0	< 0,01	0,05	0
1:5 oder 1:20 verdünntes Standard-Normalpl.	61,5	53,2	27,8	59,6	74,4	65,2
	0,2	0,2	0,05	0,18	0,2	0,2
1:50 oder 1:200 verdünntes Standard-Normalpl.	88,3	73,9	47,0	95,2	112,5	111,7
	0,02	0,02	0,005	0,018	0,02	0,02
Puffer	139,7	108,5	65,6	223,8	163,5	> 500
	0	0	0	0	0	0
						sec
						U/ml ▲
						sec
						U/ml ▲
						sec
						U/ml ▲

Tab. 3 Der Einfluß von Protaminsulfat auf die Gerinnung verschiedener Mangelplasmen

- Einphasentest basierend auf der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)
- Einphasentest basierend auf der Thromboplastinzeit (Quick)
- ▲ Gerinnungsaktivität des Zusatzes in Einheiten pro Milliliter

Mangel- plasma	+ Puffer		+ St.Pl.1:5		+ Protamin- sulfat		+ Poly- lysin		F VIII:AG oder F IX:AG U/ml
	PTT sec	C-Aktiv U/ml	PTT sec	C-Aktiv U/ml	PTT sec	C-Aktiv U/ml	PTT sec	C-Aktiv U/ml	
M VIII a	108,5	0	53,2	0,2	47,4	0,56	83,4	0,01	0,54
M VIII b	124,8	0	59,8	0,2	53,4	0,54	72,7	0,05	1,1
M VIII c	103,1	0	56,7	0,2	41,4	>1,0	69,9	0,05	0,68
M IX a	139,8	0	61,5	0,2	56,0	0,4	54,2	0,54	0
M IX b	104,6	0	54,4	0,2	45,3	1,0	60,0	0,1	0,27
M XI a	163,5	0	74,4	0,2	93,4	0,05	131,5	<0,01	---
M XI b	125,7	0	61,5	0,2	90,1	0,02	71,5	0,07	---

Tab. 4 Zusammenfassung der Befunde von den Mangelplasmen, bei denen Protaminsulfat und Polylysin eine gerinnungsfördernde Wirkung haben

M : kongenitales Mangelplasma F VIII:AG: Faktor VIII-assoziiertes Antigen
 C-Aktiv: Gerinnungsaktivität
 St.Pl. : Standard-Normalplasma F IX:AG : Faktor IX-Antigen
 Protaminsulfat und Polylysin jeweils in Konzentrationen von 0,1 mg/ml

3.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Einleitend läßt sich basierend auf den Tabellen 2 und 3 sagen, daß Protaminsulfat nur auf Faktor VIII-, IX- und XI-Mangelplasma eine gerinnungsverkürzende Wirkung ausübt. Eine Zusammenfassung der korrigierend beeinflussten Plasmen zeigt Tab. 4.

Die Wirkung auf die drei getesteten Faktor VIII-Mangelplasmen und die zwei Faktor IX-Mangelplasmen ist eindeutig. Wobei als Extremwert ein Faktor VIII-Mangelplasma eine Gerinnungszeit aufwies, die einer Aktivität des F VIII:C von $>1,0$ U/ml entspricht. Der geringste Wert wurde von dem Faktor IX-Mangelplasma "b" erreicht, - mit aber immer noch $0,4$ U/ml.

Auch die zwei geprüften Faktor XI-Mangelplasmen lassen eine deutliche Verkürzung ihrer PTT erkennen. Bezogen auf deren Standardplasmaeichkurven ergeben sich hier aber nur die relativ geringen Aktivitäten von $0,05$ U/ml und $0,02$ U/ml.

Auf alle drei genannten Mangelplasmen wirkt auch Polylysin in aktivierender Weise ein. Ein positiv geladenes Polypeptid ist also anscheinend der entscheidende Faktor.

Hier ist besonders auffällig die Divergenz der Werte und der fehlende quantitative Zusammenhang mit den Ergebnissen unter Protaminsulfat. So zeigt sich hier allgemein ein schwacher Effekt auf Faktor VIII-Mangelplasma; wo mit einer zugeordneten Aktivität von $0,053$ U/ml für das Faktor VIII-Mangelplasma "c" noch die beste Wirkung erzielt wird.

Im Gegensatz dazu ist die Polylysinwirkung auf Faktor IX-Mangelplasmen ausgeprägter; im Falle des Plasmas "a" übersteigt sie

mit 0,54 U/ml sogar den Protaminsulfateffekt von 0,4 U/ml.

Im Falle des Faktor IX-Mangelplasmas "b" hingegen ist wieder die Protaminsulfatwirkung zehnfach stärker ausgeprägt.

Für die Faktor XI-Mangelplasmen sei das Plasma "b" herausgehoben, das mit Polylysin eine Aktivität von 0,07 U/ml zeigt, die damit die Protaminsulfataktivität desselben Plasmas um 0,05 U/ml übersteigt.

Für die so unterschiedliche Wirkungsstärke von Protaminsulfat und Polylysin bei den verschiedenen korrigierbaren Mangelplasmen sind vermutlich individuelle Unterschiede in der molekularen Struktur des Defektes der Mangelplasmen verantwortlich, wie auch generell deren, - wenn auch nur geringgradige, - differente Plasmaproteinbeschaffenheit.

Zur Charakterisierung der Mangelplasmen bei Tab. 4 wurde bei den Faktor VIII-Mangelplasmen das F VIII:R:AG, bei den Faktor IX-Mangelplasmen das F IX:AG bestimmt. (Näheres hierzu bei 3.9)

Eine Korrelation des F VIII:R:AG in den Faktor VIII-Mangelplasmen mit der Ausprägung des Protaminsulfateffektes läßt sich nicht nachweisen. Hervorgehoben werden aber soll das Faktor IX-Mangelplasma "a", das kein immunologisch nachweisbares Faktor IX-Molekül aufweist, aber dennoch in vollem Maße durch beide Polykationen korrigiert werden kann. Bei diesem Mangelplasma ist der Polylysineffekt weitaus am stärksten.

Für alle übrigen getesteten Faktoren war keine Substitution ihrer Aktivität durch Protaminsulfat möglich. Bei Zusatz von Protaminsulfat zu Tests mit Mangelplasmen der Faktoren II, X, VII und

Fletcher-Faktor (Präkallikrein) stellte sich sogar eine gerinnungshemmende Wirkung heraus.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Versuchsreihen kann der Nachweis angesehen werden, daß die Faktoren der Kontaktphase des intrinsischen Gerinnungssystems, bzw. deren proteolytische Aktivitäten, auch bei der Gerinnung unter Protaminsulfateinfluß benötigt werden. Welche Bedeutung der Faktor XI hat, läßt sich nicht schlußfolgern, da die Faktor XI-Mangelplasmen in geringem Grade durch Protaminsulfat korrigiert werden konnten. Sicherlich kann seine enzymatische Funktion nicht gänzlich bedeutungslos sein. Für die erzielten Gerinnungszeitverkürzungen könnten noch vorhandene Restaktivitäten in den Faktor XI-Mangelplasmen verantwortlich sein. (Siehe dazu auch die abschließende Diskussion)

Der nicht erzielbaren Korrektur von Faktor XII- und Fletcher-Faktor-Mangelplasma wegen, ist die Erklärung der Protaminsulfatwirkung über eine Präzipitation von Fibrinogen ausgeschlossen. Auch die direkte Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) in Thrombin kommt so nicht in Betracht, ebensowenig wie die unmittelbare Erzeugung von aktiviertem Faktor X. Die beiden ersten Schlüsse werden noch unterstützt durch die Tatsache, daß auch Faktor II und Faktor X genauso wie Faktor V weiterhin notwendige Reaktionspartner sind.

Bestünde der Protaminsulfateffekt aber in einer reinen Beschleunigung der Thrombinwirkung auf Fibrinogen, so müßten auch andere Mangelplasmen als die der Faktoren VIII und IX korrigiert werden. Weiterhin wäre dann auch eine deutliche Gerinnungsverkürzung von Normalplasma zu erwarten. Beides ist jedoch nicht der Fall, (siehe dazu Abb. 5).

3.3 Der Einfluß von Phospholipiden und Kaolinaktivierung auf den Protaminsulfat- und Polylysineffekt

3.3.1 Fragestellung

Nachdem im vorigen Kapitel festgestellt war, daß die Anwesenheit von Faktor XII erforderlich ist, stellt sich nun die Frage, ob für die Wirkung der polykationischen Verbindungen eine Aktivierung des Systems durch Kaolin erforderlich ist.

Eine Aktivierung des Faktors XII durch Bindung an eine negativ geladene Oberfläche und daraus folgende konformative Änderung entspricht zwar der durchaus herrschenden Meinung der Literatur (5), jedoch kommen auch andere molekulare Mechanismen einer Aktivierung in Betracht. So z.B. die Bildung von stöchiometrischen, löslichen Komplexen von Faktor XII mit Ellagsäure (107).

Da Phospholipide für die Formation von Aktivatorkomplexen für den Faktor X als auch für das Prothrombin benötigte Bestandteile sind (siehe hierzu bei 1.2.2), sollte hier auch deren Bedeutung für den Protaminsulfateffekt geprüft werden.

3.3.2 Versuchsbeschreibung

Anwendung als Testsystem fand wieder die PTT nach 2.1.1. Die untersuchten Plasmen waren Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasmen und als Kontrolle Standard-Normalplasma. Als Zusatz zum Testsystem wurden Protaminsulfat und Polylysin jeweils in der Konzentration von 100 µg/ml geprüft sowie Pufferlösung.

Das Testsystem wurde nun auf drei Arten variiert:

- 1.) Anwesenheit von Phospholipiden und Kaolin
- 2.) Anwesenheit nur von Kaolin
- 3.) Anwesenheit nur von Phospholipiden

Zu 1.) wurde das komplette PTT-Reagens, beschrieben bei 2.1.1, verwendet. Zu 2.) wurde nur die Kaolinsuspension des PTT-Reagens verwendet. Zu 3.) wurde die Phospholipidlösung genommen, indem die lyophilisierten Phospholipide desselben Reagens, statt in Kaolinsuspension, in DBA-Puffer gelöst wurden.

3.3.3 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 7 sind unter a) dargestellt die Kontrolle durch Puffer, in b) und c) die Beeinflussung bei Zugabe von Protaminsulfat bzw. Polylysin.

Bei der Pufferkontrollgruppe a) fällt zunächst auf, daß bei Abwesenheit von Phospholipiden Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma praktisch ungerinnbar wird (keine Gerinnung nach 500 sec) im Gegensatz zum relativ geringen Effekt der Verlängerung der PTT von Normalplasma von 50 sec auf 88,5 sec.

Da die Gerinnungstests in Plastikröhrchen (deren Oberfläche keine Kontaktaktivierung bewirkt) durchgeführt wurden, ließ sich erwartungsgemäß bei Abwesenheit von Kaolin als Kontaktaktivator bei keinem der Plasmen innerhalb von 500 sec eine Gerinnung erzielen.

Die Protaminsulfatgruppe b) zeigt bei Anwesenheit von Kaolin die schon beschriebene Angleichung der PTT von Faktor VIII- und

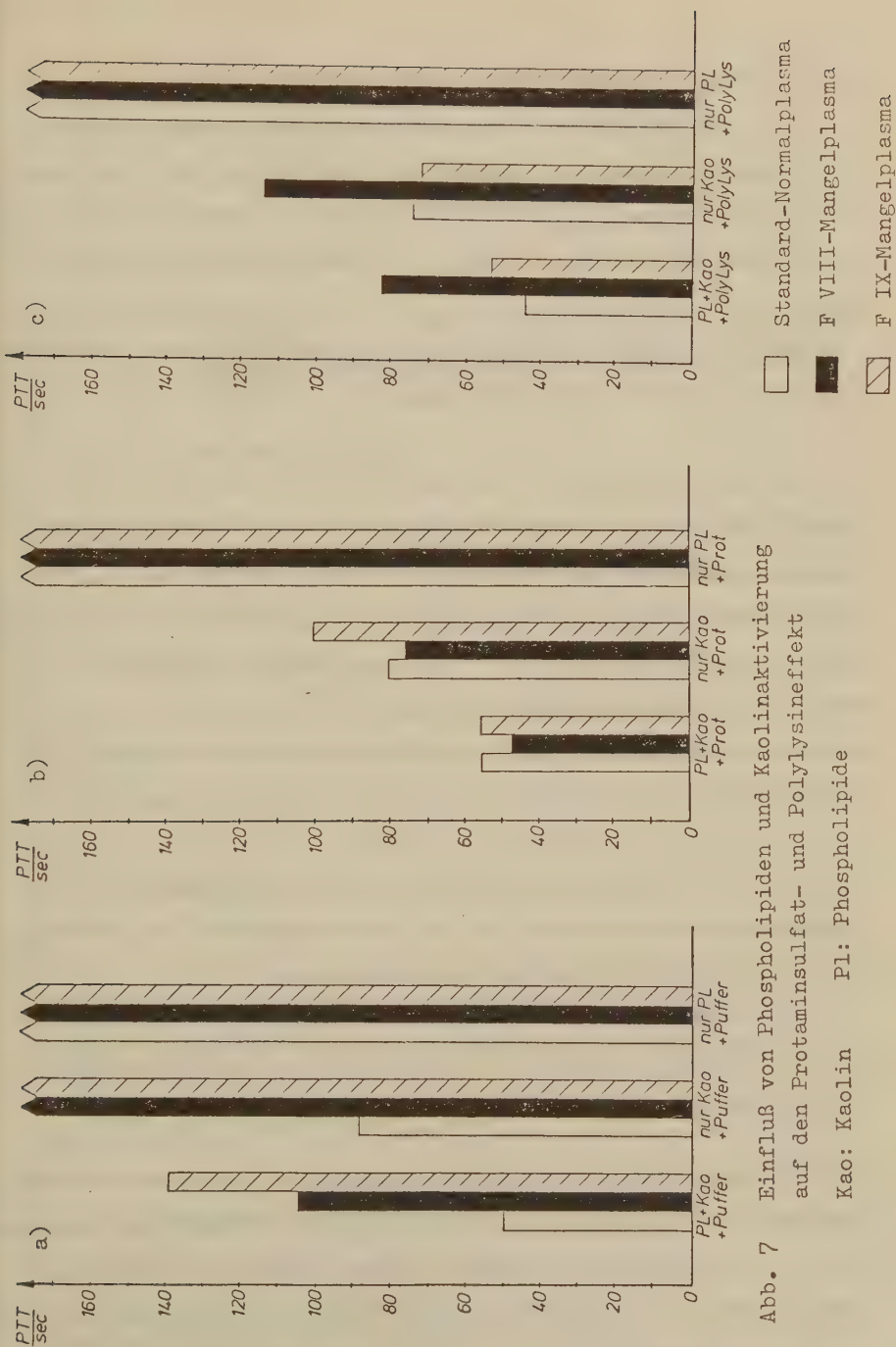


Abb. 7 Einfluß von Phospholipiden und Kaolinaktivierung auf den Protaminsulfat- und Polylysineffekt

Faktor IX-Mangelplasma an die des Normalplasmas. Sind keine Phospholipide im Ansatz, so ergibt sich jetzt wieder eine deutliche Verkürzung der Gerinnungszeiten von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma, wobei für das Faktor VIII-Mangelplasma sogar eine geringfügig kürzere Zeit als für das Normalplasma erreicht wird.

Ohne Kaolin im Ansatz läßt sich bei keinem der Plasmen innerhalb von 500 sec eine Gerinnung erzielen.

Für die Polylysingruppe c) läßt sich feststellen, daß bei Anwesenheit von Kaolin und Phospholipiden die schon unter 3.2.3 beschriebene Normalisierungstendenz für Faktor VIII- und für Faktor IX-Mangelplasma ebenfalls besteht. Die Wirkung des Polylysins ist hier aber, im Gegensatz zu der des Protaminsulfates bei b), für Faktor IX-Mangelplasma deutlich besser.

Wie bei den Gruppen a) und b) erwähnt, läßt sich auch bei Polylysinzugabe ohne Kaolin keine Gerinnung erzielen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Kaolinaktivierung eine unabdingbare Voraussetzung für die gerinnungsfördernde Wirkung der beiden polykationischen Verbindungen ist.

Die Anwesenheit von exogen zugeführten Phospholipiden ist nicht für den Effekt erforderlich, jedoch zeigt sich erwartungsgemäß eine Verzögerung der Gerinnung, wenn Phospholipide fehlen.

Besonders deutlich wird die Effektivität von Protaminsulfat und Polylysin, wenn man berücksichtigt, daß ohne Phospholipide im Ansatz Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma praktisch ungerinnbar sind. Durch den Zusatz der polykationischen Verbindungen tritt eine weitgehende Annäherung an die Zeiten des Normalplasmas wieder ein.

3.4 Die Zeitabhängigkeit des Protaminsulfateffektes

3.4.1 Die Zeitdauer der Protaminsulfatwirkung

3.4.1.1 Fragestellung

Es sollte die Zeitdauer der PTT-Korrektur durch Protaminsulfat von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma ermittelt werden.

3.4.1.2 Versuchsbeschreibung

Als Test verwendet wurde die PTT wie unter 2.1.1 beschrieben.

Zu jeweils 2 ml Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma wurde 20 μ l von einer 10 mg/ml Protaminsulfatlösung gegeben, so daß die Protaminsulfatkonzentration in den Plasmen 100 μ g/ml betrug. Diese Plasmen wurden in Plastikröhrchen in einem auf 37°C thermostatisierten Wasserbad für acht Stunden inkubiert und in regelmäßigen Abständen Proben daraus entnommen zur Bestimmung der PTT. Damit das Volumen des Testsystems immer 0,4 ml betrug, wurde 0,1 ml Puffer zum Testansatz hinzugefügt.

Um einen Vergleich der Korrektur der Mangelplasmen, erreicht durch Protaminsulfatzusatz oder Standard-Normalplasmazusatz, zu ermöglichen, wurden ebenfalls je 2 ml Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma mit je 0,4 ml Normalplasma versetzt und über denselben Zeitraum bei 37°C inkubiert - unter regelmäßiger Probenentnahme zur PTT-Bestimmung. Zur Analogisierung der Testanordnung mußten jeweils 120 μ l Mangelplasmaprobe aus dem Inkubationsgemisch mit 80 μ l Puffer versetzt werden.

Um einen Vergleich der Protaminsulfatwirkungen bei Inkubation

von Protaminsulfat enthaltenden Mangelplasmen mit nativen Mangelplasmen, denen erst unmittelbar vor Testdurchführung Protaminsulfat zugesetzt wurde, zu ermöglichen, wurde folgende Anordnung gewählt:

Je zwei Milliliter Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma wurden für acht Stunden bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen erfolgte wieder die Entnahme eines Anteils, dessen PTT nach Zugabe des üblichen Zusatzes an Protaminsulfat (100 µg/ml) bestimmt wurde.

3.4.1.3 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst werden die Ergebnisse, die in Abb. 8 dargestellt sind, erläutert. Es ergibt sich, daß für das Faktor VIII-Mangelplasma der verkürzende Effekt auf die PTT mit einer Halbwertszeit von ca. 4 h abklingt. Nach 6 h Inkubation ist wieder der pathologische Ausgangswert erreicht. Die Abklingkurve zeigt einen ange deuteten S-förmigen Verlauf.

Das Faktor IX-Mangelplasma zeigt, mit etwas mehr als 2 h Halbwertszeit des Protaminsulfateffektes, einen deutlich schnelleren Aktivitätsverlust als das Faktor VIII-Mangelplasma. Jedoch ist hier der Wirkungsverlust am Anfang viel stärker, um dann nach Art einer Sättigungskurve auszulaufen. Der S-förmige Verlauf der Kurve ist beim Faktor IX-Mangelplasma ausgeprägt.

Die Kontrolle der durch Normalplasma korrigierten Mangelplasmen zeigt an, daß die Gerinnung über den Inkubationsverlauf unter diesen Bedingungen nahezu unverändert bleibt: Beim Faktor VIII-Mangelplasma wird ein leichter Anstieg, beim Faktor IX-Mangel-

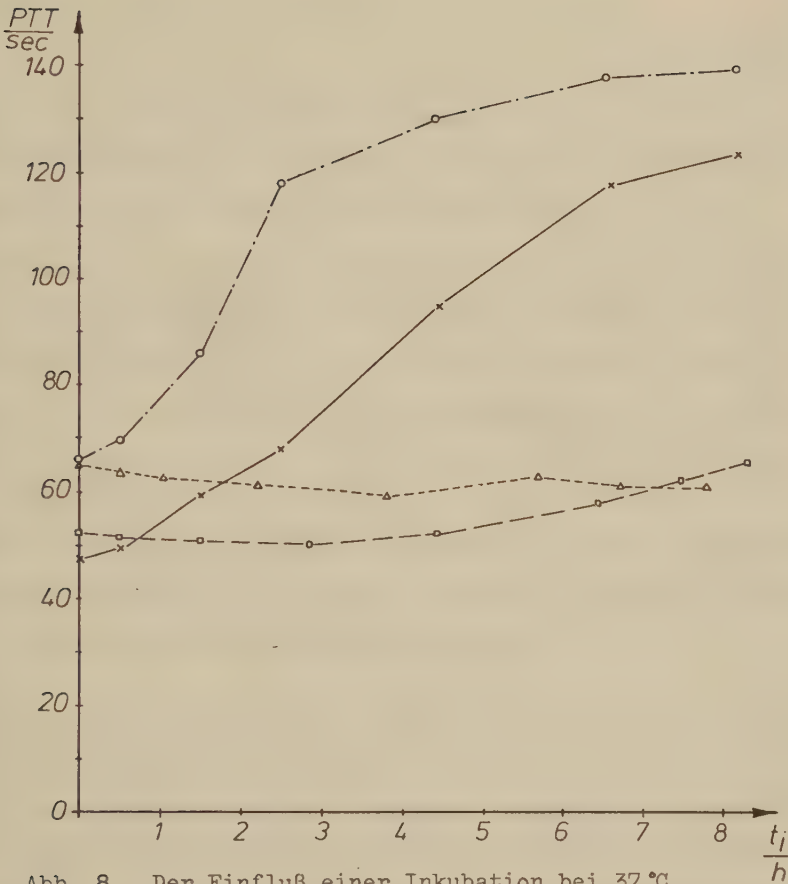


Abb. 8 Der Einfluß einer Inkubation bei 37 °C auf die PTT von F VIII- und F IX-Mangelplasma, das durch Protaminsulfat oder Standard-Normalplasma korrigiert wurde

—x— F VIII-Mangelpl. incl. 0,1 mg/ml Prot.Sulf.

—o— F IX -Mangelpl. incl. 0,1 mg/ml Prot.Sulf.

—o— F VIII-Mangelpl. incl. 1/5 Vol. St.Pl.

—Δ— F IX -Mangelpl. incl. 1/5 Vol. St.Pl.

t_i : Inkubationszeit bei 37 °C

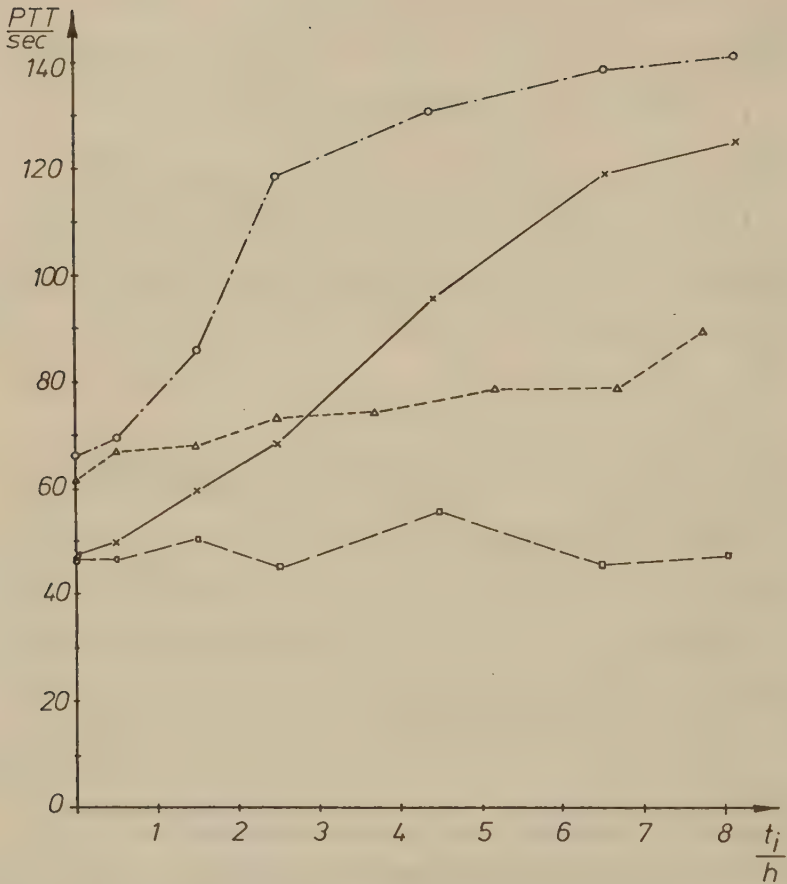


Abb. 9 Die Bedeutung des Zeitpunktes der Protaminsulfatzugabe zu F VIII- und F IX-Mangelplasma, das bei 37°C inkubiert wurde

x—x F VIII-Mangelpl. incl. 0,1 mg/ml Prot.Sulf. bei 37°C

o—o F IX-Mangelpl. incl. 0,1 mg/ml Prot.Sulf. bei 37°C

o—o F VIII-Mangelpl. bei 37°C

x—x F IX-Mangelpl. bei 37°C

} Zugabe von Protaminsulfat erst unmittelbar vor der Testdurchführung

t_i : Inkubationszeit bei 37°C

plasma ein angedeuteter Abfall der PTT beobachtet.

Für das Faktor VIII-Mangelplasma ergibt sich eine Verlängerung der PTT nach 8 h gegenüber dem Ausgangswert um 14 sec, was aber bei der bekannten Labilität des Faktors VIII und dessen geringem Anteil an diesem Testsystem zu erklären ist.

Zur besseren Veranschaulichung sind in Abb. 9 die Verläufe der Aktivitätsabnahme von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma unter Protaminsulfateinfluß nochmals dargestellt. Darunter sind für jedes Mangelplasma die Kurven eingezeichnet, die sich ergeben, wenn das jeweilige Plasma erst bei der Testdurchführung mit Protaminsulfat versetzt wurde.

Dabei offenbart das Faktor VIII-Mangelplasma, über die gesamte Inkubationsperiode hin, stets völlige Korrigierbarkeit; beim Faktor IX-Mangelplasma nimmt diese etwas ab.

Als entscheidendes Ergebnis dieser Versuche soll genannt werden, daß die Wirkung des Protaminsulfates, wenn es zusammen mit dem Plasma inkubiert wird, nach wenigen Stunden nicht mehr nachweisbar ist. Dieser Sachverhalt beruht aber offensichtlich nicht auf durch die Inkubation bewirkten Änderungen von Komponenten der Mangelplasmen, da beide Mangelplasmen sich stets korrigieren lassen, wenn das Protaminsulfat erst unmittelbar vor der Bestimmung der Gerinnungszeit hinzugefügt wird. Auch wenn die Mangelplasmen zusammen mit einem korrigierenden Anteil an Normalplasma inkubiert werden, bleibt die Normalisierung der PTT erhalten, was ebenfalls für die o.g. Schlußfolgerung spricht.

Um die Abklingkurven zu erklären, können zwei Überlegungen herangezogen werden:

- Eine für den Protaminsulfateffekt erforderliche Plasmakomponente wird durch Komplexbildung mit Protamin so verändert, daß daraus eine relative Labilität bei 37°C folgt (z.B. erleichterter Inhibitorangriff oder enzymatischer Abbau)
- oder das Protamin wird selbst enzymatisch abgebaut, woraus sich dann der Wirkungsverlust auf einfache Weise erklären ließe.

Für die zweite Möglichkeit sprechen die Ergebnisse von SAMPAIO et al. (108), die zeigen konnten, daß Salmin (ein Protamin aus Lachssperma) durch Kallikrein vom Pferd proteolytisch abgebaut wird. Die Generation von geringen proteolytischen Aktivitäten, speziell die Bildung von Kallikrein im Plasma durch die Kontaktaktivierung von Faktor XII während der mehrstündigen Inkubationsperiode, ist durchaus anzunehmen, auch wenn die Inkubation im Plastikröhrchen erfolgte.

3.4.2 Der Zeitverlauf der Aktivierungsphase

3.4.2.1 Fragestellung

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde stets das kontakt-aktivierende PTT-Reagens und die Protaminsulfatlösung zum selben Zeitpunkt in den Testansatz pipettiert. Bis zum Start der Gerinnung durch Rekalkifizierung konnte das Protaminsulfat also immer 180 sec auf den Testansatz einwirken.

Um zu prüfen, wie lange und zu welchem Zeitpunkt das Protaminsulfat zur Aktivitätsentfaltung auf das Testsystem einwirken muß und um die Kinetik der Aktivierungsphase zu erfassen, erschien es angebracht, das Protaminsulfat erst nach kompletter Kontaktaktivierung des Mangelplasmas hinzuzufügen. Dies vor allem deshalb, um die schwer interpretierbare Interferenz der Kaolin-Kontaktaktivierung mit der Protaminsulfataktivierung auszuschließen.

Die Resultate dieses Versuches könnten Aufschluß geben über die Natur des Effektes, vor allem ob die Wirkung auf der zeitabhängigen Aktivierung von Enzymsystemen beruht.

3.4.2.2 Versuchsbeschreibung

Als Test fand wieder die PTT nach 2.1.1 Anwendung. Um damit feststellen zu können, nach welcher Zeit die Kontaktaktivierung eines Plasmas durch Kaolin abgeschlossen sein würde, wurde folgende Testanordnung gewählt:

Es wurde die PTT von Standard-Normalplasma (mit Puffer als Zusatz) bestimmt, wobei jeweils die Einwirkungszeiten des PTT-Reagens bis zur Rekalkifizierung variiert wurden.

Die Ergebnisse dieses Vorversuches - das sei hier vorweggenommen - ergaben, daß nach 150 sec Aktivierungszeit praktisch keine weitere Verkürzung der PTT erfolgte (Abb. 10). Die Annahme einer vollständigen Kontaktaktivierung nach 180 sec Einwirkungszeit des PTT-Reagens ist also begründet.

Zur Ermittlung der Protaminsulfatwirkung auf Faktor VIII-Mangelplasma wurde demzufolge so vorgegangen:

im Plastikröhrchen bei 37°C

0,1 ml Faktor VIII-Mangelplasma

0,08 ml Puffer

0,1 ml PTT-Reagens

nach 3 min Inkubation bei 37°C

0,02 ml Protaminsulfatlösung 0,5 mg/ml

oder Standard-Normalplasma oder Puffer;

Inkubation des Gemisches für jeweils

0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 sec

0,1 ml 0,025 Mol/l CaCl_2 -Lösung

Um den Verdünnungseffekt möglichst klein zu halten, erfolgte die Zugabe des Testzusatzes in dem geringen Volumen von 0,02 ml.

Zusammenfassend gesagt, wird durch dieses Testsystem erfaßt, wie lange Protaminsulfat auf maximal kontaktaktiviertes Faktor VIII-Mangelplasma einwirken muß, um eine bestimmte Aktivierung zu erzielen. Der Zusatz von Puffer bzw. Normalplasma dient dabei als Kontrolle.

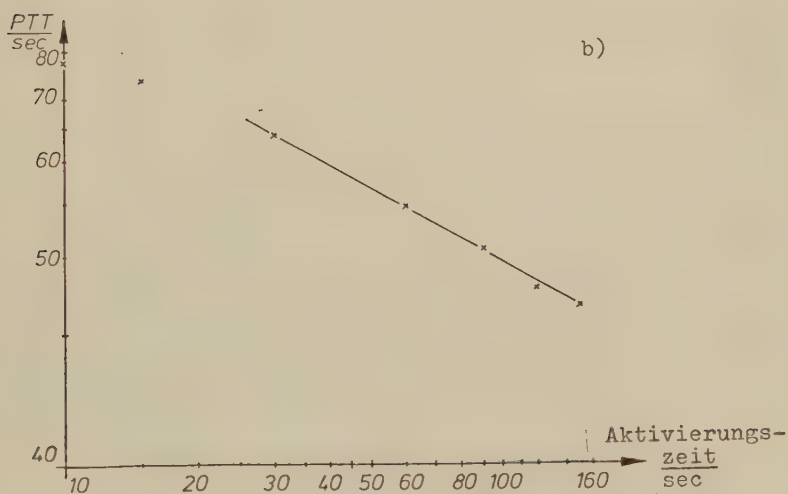
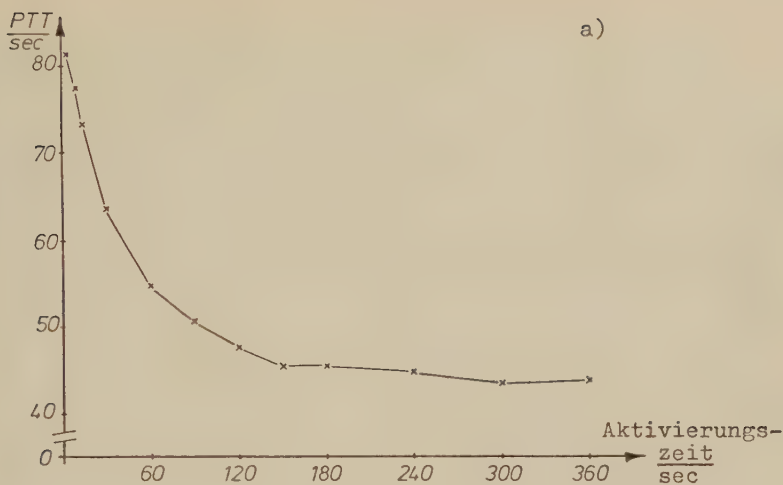


Abb. 10 Die Abhängigkeit der PTT von Standard-Normalplasma von der Dauer der Aktivierung durch Kaolin und Phospholipide

a) lineare Darstellung

b) doppelt-logarithmische Darstellung

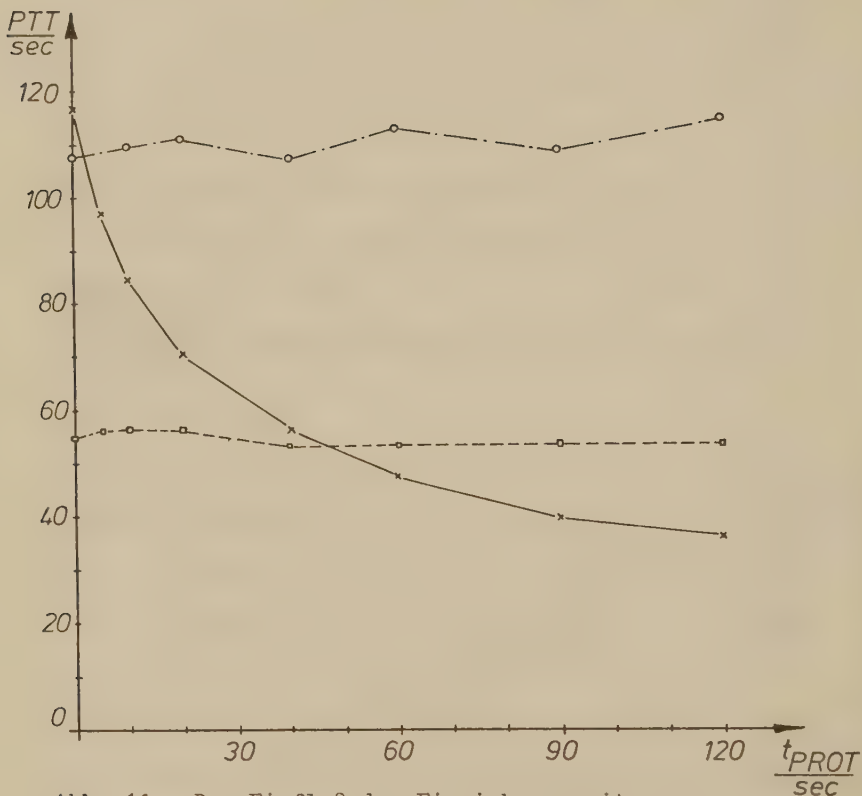


Abb. 11 Der Einfluß der Einwirkungszeit von Protaminsulfat und Standard-Normalplasma auf maximal kontaktaktiviertes F VIII-Mangelplasma

x—x F VIII-Mangelpl. + Prot.Sulf. 0,1 mg/ml

o—o F VIII-Mangelpl. + Puffer

o---o F VIII-Mangelpl. + St.Pl. 1:5 verd.

t_{PROT} : Einwirkungszeit von Protaminsulfat (St.Pl., Puffer) vor der Rekalzifizierung

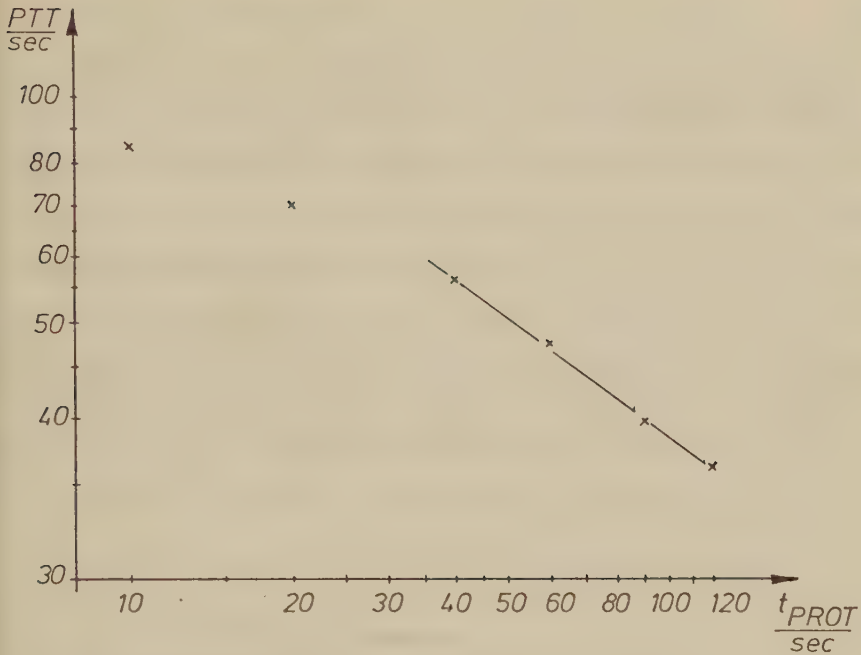


Abb. 12 Die PTT von Faktor VIII-Mangelplasma in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit des Protaminsulfat, in doppelt-logarithmischer Darstellung

t_{PROT} : Einwirkungszeit von Protaminsulfat vor der Rekalzifizierung

3.4.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Bei der Analyse von Abb. 11 ergibt sich ein biphasischer Verlauf der Entwicklung des Protaminsulfateffektes. Wird Protaminsulfat zusammen mit Kalziumchlorid zum Testsystem hinzugefügt, so ist ein geringer inhibitorischer Effekt zu beobachten. Nehmen die Einwirkungszeiten von null bis 40 sec zu, so entsteht eine stark zunehmende Aktivität, die bei dem weiteren Zeitverlauf, bis

120 sec im flacheren Teil der Kurve, noch weiter zunimmt. Der Pufferleerwert des Faktor VIII-Mangelplasmas ändert sich bei derselben Testdurchführung nicht auffällig, genauso wenig wie die Gerinnungszeiten des durch Normalplasma korrigierten Mangelplasmas.

Wenn man die biphasische Aktivierungskurve des Protaminsulfates von Abb. 11 auf doppelt-logarithmisches Papier aufträgt (Abb. 12), ergibt sich eine Gerade. Ebenfalls entsteht eine Gerade beim Auftrag der Kaolinaktivierungszeit von Abb. 10 a) auf doppelt-logarithmisches Papier (Abb. 10 b)). Das zeigt an, daß der Grundmechanismus bei beiden Aktivierungsprozessen der gleiche sein muß.

Beim Auftragen der Gerinnungszeit gegen die Konzentration eines Gerinnungsfaktors im Einphasen-Testsystem, in dem ja alle Faktoren außer dem Mangelfaktor vorhanden sind, ergibt sich bekanntermaßen auch eine Gerade. (Siehe hierzu bei 2.1.3, Abb. 4)

Es zeigt sich also eine Analogie von zwei differenten Testsystemen:

- 1.) Die Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Aktivierung durch Kaolin oder Protaminsulfat
- 2.) Die Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Konzentration eines Gerinnungsfaktors

Die Erklärung dieser Analogie liegt darin, daß nach einer bestimmten Zeit der Aktivierung in der Testanordnung 1.) eine dazu korrespondierende Konzentration an Aktivierungsprodukt vorliegt, so daß auch in diesem System letztlich die Korrelation der Gerinnungszeit zu der Konzentration eines Gerinnungsfaktors, genau

wie bei 2.), gemessen wird.

Die hier verwendete Bezeichnung "Aktivierungsprodukt" bedeutet lediglich, daß durch einen wie auch immer gearteten aktivieren- den Prozeß Faktoren entstehen, die in der Gerinnungskaskade eine Funktion erfüllen. Wobei der "Faktor" natürlich auch ein Komplex mehrerer Komponenten sein kann.

Beim Erhalt einer Geraden, wenn die Gerinnungszeit gegen die Konzentration eines Faktors auf doppelt-logarithmisches Papier aufgetragen wird, muß folgende mathematische Beziehung gelten:

$$\log t_c \sim -\log c \quad (1)$$

t_c : Gerinnungszeit

c : Konzentration des Gerinnungsfaktors

$\sim$: "direkt proportional zu"

Das Minuszeichen steht vor $\log c$, weil bei steigender Konzentration des Faktors die Gerinnungszeit kürzer wird.

Nach den Regeln der Logarithmenrechnung ergeben sich die Umformungen:

$$\log t_c \sim \log \frac{1}{c}$$

$$t_c \sim \frac{1}{c} \quad (2)$$

Die Gerinnungszeit verhält sich also umgekehrt proportional zur Konzentration des Gerinnungsfaktors.

Für die vollständige Charakterisierung der Relation zwischen Gerinnungszeit und Gerinnungsfaktor-Konzentration geben HEMKER et al. (109,110) an:

$$t_c = a \cdot \frac{1}{c} + b \quad (3)$$

t_c : Gerinnungszeit

c : Konzentration des Gerinnungsfaktors,
der die Reaktion begrenzt

a und b : Konstanten

Für die aktuelle Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion gilt nach MICHAELIS und MENTEN [Ableitung nach (111)] :

$$\frac{1}{v} = a \cdot \frac{1}{c} + b \quad (4)$$

v : Reaktionsgeschwindigkeit

c : eigentlich Substratkonzentration, jedoch
ist bei der Gerinnungskaskade zu berücksichtigen, daß ein Substrat zum Enzym wird

a und b : Konstanten

HEMKER et al. (2) wiesen auf die Analogie der Gleichungen 3 und 4 hin und bewiesen, daß das dadurch implizierte reziproke Verhältnis von Gerinnungszeit und Gerinnungsgeschwindigkeit tatsächlich besteht.

Daraus läßt sich aber der wichtige Schluß ziehen, daß immer dann, wenn die Beziehung 1 gilt, die Befunde einer gerinnungsanalytischen Untersuchung mit den Gesetzen der Enzymkinetik nach MICHAELIS und MENTEN in Einklang sind.

Die Verhältnisse der Gerinnung sind aber durch die Aneinanderreihung vieler enzymatischer Reaktionsschritte von der einfachen Reaktionsmischung von Enzym und Substrat bei der Aufstellung der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik verschieden. Es gilt jedoch auch für die Gerinnungskaskade, - wie bei jeder chemischen Reaktionskette -, daß die Gesamtgeschwindigkeit durch die langsamste Reaktion bestimmt wird. Bezogen auf die Protaminsulfatkorrektur von Faktor VIII-Mangelplasma ist dann nach Abb. 11 besonders zu beachten, daß bei zunehmender Einwirkungszeit des Protaminsulfates die Reaktionsgeschwindigkeit nach der Rekalzifizierung ansteigt.

Für jede enzymatische Reaktion gilt folgende Reaktionsgleichung:



E : Enzym

S : Substrat

ES : Enzym-Substrat-Komplex

P : Produkt

k : Geschwindigkeitskonstante

Dabei ist die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes der weit-
aus langsamere Schritt und damit geschwindigkeitsbestimmend (111).

Daraus wiederum ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit der gesamten Enzymkatalyse:

$$v = k_{+2} \cdot [ES] \quad (6)$$

Steht nun nur eine bestimmte Menge Substrat zur Verfügung, so kommt es nach Umsetzung zum Produkt zum Stillstand der enzymatischen Reaktion, d.h. v wird zu null. Für die Gerinnung gelten nun andere Verhältnisse, da das entstehende Produkt seinerseits wieder ein Enzym ist, das den Gerinnungsprozeß weiterlaufen läßt sowie dessen Geschwindigkeit und Zeitdauer bestimmt.

Die bisher gemachten Darstellungen befinden sich mit der Vorstellung in Einklang, daß nach Zugabe von Protaminsulfat zu Faktor VIII-Mangelplasma in diesem Plasma in zeitabhängiger Weise eine enzymatische Aktivität entsteht.

Die folgenden Möglichkeiten kommen daraus folgernd zur Erklärung des Protaminsulfateffektes in Frage:

1.) Durch Komplexbildung mit Protaminsulfat wird eine Plasma-komponente zum Substrat für die durch Kaolinaktivierung bereits entstandene enzymatische Aktivität. Das kann durch konformative Änderung oder durch direkte Kopplung an das Enzym-(system) geschehen. Das entstandene Produkt wäre dann gerinnungsbeschleunigend wirksam in den Aktivatorkomplexen, die sich nach Kalziumzugabe bilden.

2.) Protaminsulfat überführt durch Bindung und daraus folgende konformative Umfaltung ein Plasmaprotein in aktives Enzym. Das gilt auch in dem Sinne, daß ein bereits aktives Enzym

dadurch eine erweiterte Substratspezifität erfährt.

Dieser Mechanismus ist für die Streptokinasewirkung (112) und für die Staphylokokkenkoagulase (113) bekannt. Die Wirkung des Enzyms könnte in der Spaltung einer weiteren Plasmakomponente liegen, die dann, wie unter 1.) aufgeführt, ebenfalls als Vermittler zwischen der Kontaktphase der Gerinnung und der kalziumabhängigen späteren Phase fungieren könnte.

Eine direkte Aktivierung von Faktor X ist ausgeschlossen, da sowohl Kaolin und Faktor XII als auch Fletcher-Faktor für den Protaminsulfateffekt nötig sind (siehe bei 3.2.3).

3.) Es ist daher denkbar, daß der enzymatisch aktive α -Faktor XIIa, der ein den Faktor XI aktivierendes Teilstück des Faktor XII darstellt und nach erfolgter Aktivierung an die Oberfläche des Kaolins adsorbiert bleibt (114), durch Protamin vom negativ geladenen Kaolin verdrängt wird und so unter Umgehung von Faktor IX und -VIII den Faktor X aktiviert.

4.) Ein Inhibitor könnte unwirksam gemacht werden, ebenfalls durch Komplexierung mit Protamin. Dadurch entstünde aktives Enzym; die weiteren Überlegungen wären dieselben wie unter 2.).

Welcher dieser hier genannten Hypothesen nach weiteren Ergebnissen der Vorzug zu geben ist, wird in der abschließenden Diskussion erläutert.

Herausgestellt werden soll jetzt noch der Unterschied in Abb. 11 zwischen der Protaminsulfatkurve und der Korrektur des Faktor VIII-Mangelplasmas durch Normalplasma. Es ist offenbar keine

zeitbeanspruchende Veränderung durch den F VIII:C oder des F VIII:C für die durch Kalzium eingeleitete Bildung des Faktor X-Aktivatorkomplexes erforderlich. Dieser Befund stimmt gut mit der bekannten Natur des F VIII:C als Nichtenzym bzw. als Co-Faktor überein.

In den Abbildungen 10 a) und 12 liegen jeweils zwei Werte im unteren Bereich der Inkubationszeiten in einem von der Geraden abweichenden Bereich. Ein ähnlicher Befund findet sich auch bei der Aufstellung von Bezugskurven für Gerinnungsfaktoren im unteren Konzentrationsbereich. Die Erklärung dafür liegt sicher darin, daß es kein absolutes Mangelplasma gibt und auch noch Alternativen für einen bestimmten Reaktionsschritt existieren. Diese dem eigentlichen Testvorgang parallel laufenden Aktivitäten machen sich natürlich im unteren Konzentrationsbereich dann meßbar gerinnungsverkürzend bemerkbar.

3.5 Die Bedeutung der Kontaktphase der Gerinnung
 für den Protaminsulfateffekt

3.5.1 Die Aktivierung des Testsystems durch Ellagsäure

3.5.1.1 Fragestellung

Unter 3.3.3 wurde als Ergebnis beschrieben, daß die Aktivierung durch Kaolin eine unbedingte Voraussetzung für die Protaminsulfatwirkung sei.

Für eine optimale Gerinnungsauslösung durch Kaolin sind die Faktoren XII, Präkallikrein (Fletcher-Faktor) und hochmolekulares Kininogen (Fitzgerald-Faktor) erforderlich, wobei die Adsorption der genannten Faktoren an die negativ geladene Kaolinoberfläche von einer entscheidenden Bedeutung ist (115,116).

Im Gegensatz dazu steht bei der Aktivierung des Faktors XII durch Ellagsäure eine Oberfläche (Festphasengrenzfläche) nicht zur Verfügung. Faktor XIIa entsteht hier durch Anlagerung der relativ niedermolekularen Ellagsäuremoleküle (107).

Durch die Anwendung eines PTT-Reagens mit Ellagsäure als Startphasenaktivator sollte hier geklärt werden, ob lediglich die Bildung von aktiviertem Faktor XII oder ob die Formation von Aktivatorkomplexen, die an eine Festphase gebunden sind, für ein Funktionieren des Protaminsulfates als Faktor VIII und Faktor IX substituierendes Agens erforderlich ist.

3.5.1.2 Versuchsbeschreibung

Es wurde die PTT nach 2.1.1 angewendet; in diesem Fall das

PTT-Reagens mit Ellagsäure.

Als Zusatz zum Testsystem diene, analog zur Anordnung bei 3.1.2, Protaminsulfatlösung in einer geometrischen Verdünnungsreihe von 12,5 µg/ml bis zu 200 µg/ml. Die getesteten Plasmen waren Faktor VIII-Mangelplasma und Normalplasma.

3.5.1.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 13, verdeutlichen, daß durch Verwendung von Ellagsäure als Startphasenaktivator keine Verkürzung der PTT von Faktor VIII-Mangelplasma durch Protaminsulfat möglich ist.

Bemerkenswert ist hier der kürzere Pufferwert des Faktor VIII-Mangelplasmas im Vergleich zum Kaolin-PTT-Reagens. Bei Erhöhung der Protaminsulfatkonzentration erfolgt eine stetige Verlängerung der Gerinnungszeiten. Derselbe Verlauf gilt auch für Normalplasma, nur werden hier stets um etwa 30 sec kürzere Zeiten gemessen.

Ein ähnlicher Verlauf wie in Abb. 13 wurde von HOUGIE (117) auch für die Hemmung der Gerinnung der nicht durch Kaolin aktivierten PTT und der Thromboplastinzeit angegeben.

Zu beachten ist auch der Unterschied der Normalplasmakurve zur entsprechenden Kurve in Abb. 5 (Kaolin-PTT): In Abb. 5 zeigt sich ein Schwellenwerteffekt der Gerinnungshemmung: Bis etwa zu einer Protaminsulfatkonzentration von 100 µg/ml ändert sich die PTT nicht auffällig, während bei höheren Konzentrationen sich rapide eine Gerinnungshemmung bis zur Ungerinnbarkeit entwickelt. Die Ursache dieses Schwelleneffektes könnte sein:

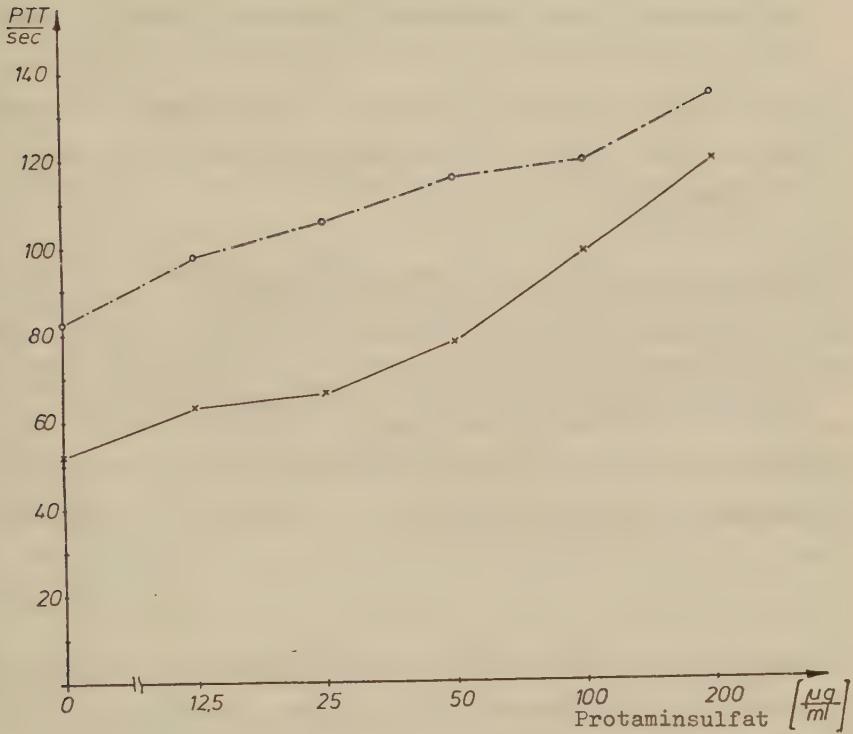


Abb. 13 Wirkung verschiedener Konzentrationen an Protaminsulfat auf F VIII-Mangelplasma und Normalplasma in einem PTT-Testsystem mit Ellagsäure als Vorphasenaktivator (ohne Kaolin)

×—× Standard-Normalplasma

o—o F VIII-Mangelplasma

- Eine kompensatorische Wirkung der gerinnungsfördernden Komponente des Protaminsulfates bis zu Konzentrationen von 100 µg/ml;
- die Bindung von Protamin an Kaolin und damit dessen Unwirksamkeit in Bezug auf eine Gerinnungshemmung (siehe dazu auch 3.5.3.3 und 3.7.3).

Da sich wegen des vorgenannten Schwelleneffektes bei der durch Kaolin aktivierten PTT erst ab Konzentrationen im Plasma von mehr als 100 µg/ml eine Gerinnungshemmung durch Protaminsulfat zeigte, erscheint es aufgrund dieser Versuche angebracht, Patienten, die zur Heparinneutralisation Protaminsulfat erhielten, nicht mit diesem Test gerinnungsphysiologisch zu überwachen. (Siehe auch 3.7.1)

Aus den Befunden dieses Versuches kann auf die Notwendigkeit von kaolungebundenen Aktivatorkomplexen geschlossen werden, wenn Protaminsulfat Faktor VIII-Mangelplasma korrigieren soll.

Als Nebebefund wäre zu erwähnen, daß wegen der geringen Differenz der Gerinnungszeiten von Mangelplasma und Normalplasma, das Ellagsäurereagens zur Diagnostik eines Faktor VIII-Mangels weniger gut geeignet ist als das Kaolin-PTT-Reagens.

3.5.2 Die Bindung von Protamin an Kaolin

3.5.2.1 Fragestellung

Die Oberfläche von Kaolin oder Porzellanerde, dessen Hauptbestandteil Kaolinit chemisch hydratisiertes Aluminiumsilikat ist (118), weist in wässriger Suspension bei dem pH-Wert üblicher Gerinnungstests eine negativ geladene Oberfläche auf. Die negative Oberflächenladung von Kaolin ist die Voraussetzung für dessen Wirkung als Kontaktaktivator für die Blutgerinnung (119).

Das argininreiche Polypeptid Protamin hingegen ist in wässriger Lösung bei pH 7,6 stark positiv geladen (120). Eine Bindung der Protaminmoleküle an suspendierte Kaolinpartikel ist daher aufgrund elektröstatistischer Kräfte anzunehmen.

Weil Kaolin für den korrigierenden Protaminsulfateffekt notwendig ist, und daher auch eine Bindung von Protamin an Kaolin im Testansatz ein bedeutsamer Vorgang sein kann, sollte das Bindungsvermögen von suspendiertem Kaolin für Protamin untersucht werden.

3.5.2.2 Versuchsbeschreibung

Um festzustellen, welche Menge Protamin an eine bestimmte Menge Kaolin gebunden werden kann, wurde die Veränderung des Meßwertes einer Proteinbestimmung herangezogen, die jeweils vor und nach Adsorption von Protaminsulfatlösung mit Kaolin durchgeführt wurde. Der Protein-Assay der Fa. Bio-Rad (siehe bei 2.4) fand für diesen Zweck Anwendung.

Und zwar wurde die Extinktion bei 595 nm, die in diesem Test der

Proteinkonzentration proportional ist, zunächst für Protaminsulfatlösungen verschiedener Konzentration bestimmt. Anschließend erfolgten parallel dazu die Messungen für die Protaminsulfatlösungen, die vorher mit einer geringen Menge Kaolin adsorbiert worden waren.

Damit dieser Versuch in seiner Volumenverteilung analog zu der hier verwendeten PTT war, wurde die folgende Testanordnung gewählt:

1.) Bezugskurve für das Protaminsulfat-Testgemisch:

0,2 ml Protaminsulfatlösung verschiedener
Konzentration und

0,6 ml DBA-Puffer pH 7,6

werden gemischt und die Extinktion bei 595 nm mit
Proteinreagens bestimmt.

2.) Kurve für kaolinadsorbierte Protaminsulfatlösungen;
Testdurchführung:

0,2 ml Protaminsulfatlösung verschiedener Konzentration

0,4 ml DBA-Puffer pH 7,6

0,2 ml Kaolinsuspension 5 mg/ml aus PTT-Reagens

Gemisch 10 min im Rüttler mischen, das Kaolin
abzentrifugieren in 10 min bei 1500 x g

Im Überstand die Extinktion bei 595 nm wie bei
1.) bestimmen.

Die Kaolinkonzentration von 1,25 mg/ml im Gesamtansatz macht
nur einen vernachlässigbar kleinen Volumenanteil aus.

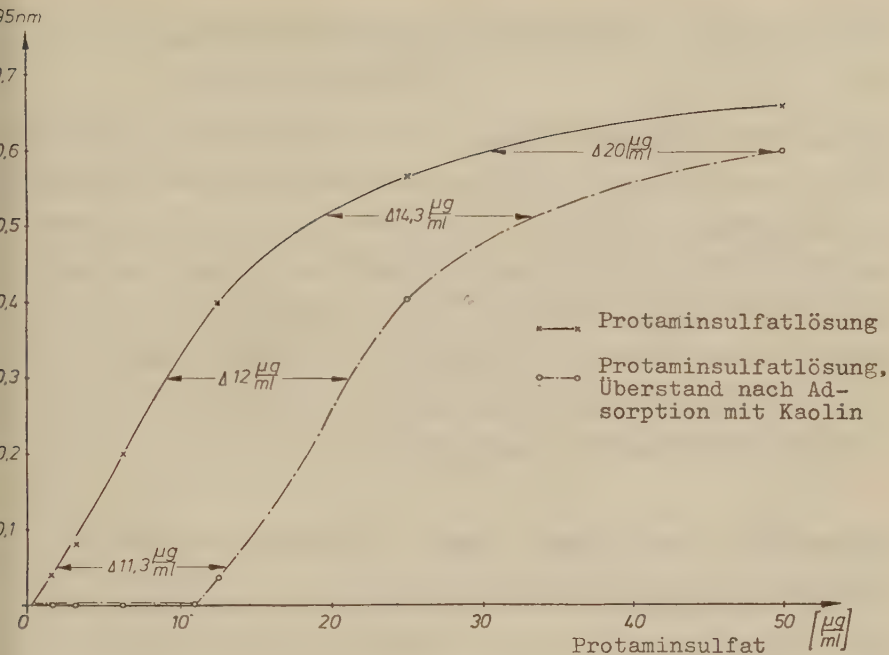


Abb. 14 Bindung von Protamin an Kaolin

Kaolinkonzentration im Ansatz: 1,25 mg/ml

Der Nachweis des Protamins erfolgte mit dem Protein-Assay nach BRADFORD

3.5.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse des Versuches sind in Abb. 14 dargestellt. Anders als in früheren Versuchen ist hier auf der Abszisse die Protaminsulfatkonzentration im Gesamtgemisch aufgetragen.

Es zeigt sich für die Kurve der mit Kaolin adsorbierten Protaminsulfatlösungen eine Verschiebung nach rechts. Die Differenz beider Kurven im unteren Konzentrationsbereich beträgt ca. 11 µg/ml.

In Abb. 14 ist der Unterschied an vier Stellen eingezeichnet.

Dabei fällt auf, daß er im höheren Konzentrationbereich größer wird.

Es kann daher angenommen werden, daß zwei Bindungsorte oder Bindungsarten am Kaolin für Protamin existieren. Zunächst werden durch stärkere Bindungskräfte ca. 11 $\mu\text{g/ml}$ Protamin von der gegebenen Kaolinmenge vollständig adsorbiert. Durch weitere Erhöhung der Protaminsulfatkonzentration kann aber auch davon noch etwas gebunden werden. Für diesen Bindungstyp gilt in etwa, daß sich bei einer Verfünffachung der Protaminsulfatkonzentration die Menge des gebundenen Protamins verdoppelt.

Die Resultate des Versuches können so zusammengefaßt werden:

Protamin geht in einer Pufferlösung bei pH 7,6 eine feste Bindung an Kaolin ein. Bei einer Protaminsulfatkonzentration von ca. 11 $\mu\text{g/ml}$ beträgt die spezifische Bindung für Kaolin: 9 μg Protamin pro 1 mg Kaolin. Darüberhinaus kann noch weiteres Protamin über andere weniger starke Bindungskräfte adsorbiert werden. So ergibt sich für eine Protaminsulfatkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eine Bindung von 16 μg Protamin pro 1 mg Kaolin.

3.5.3 Die Aktivierung des Testsystems durch einen Kaolin-Protamin-Komplex

3.5.3.1 Fragestellung

In Abschnitt 3.5.1.3 wurde gezeigt, daß die Kaolinanwesenheit für die aktivierende Wirkung des Protaminsulfates notwendig ist. Da nun im vorhergehenden Ergebnisteil eine Bindung von Protamin an Kaolin nachgewiesen wurde, sollte festgestellt werden, ob für den Protaminsulfateffekt an Kaolin adsorbiertes Protamin seine Wirkung entfaltet.

Diese Frage sollte geklärt werden, indem das Protamin komplexiert mit Kaolin zum Testsystem hinzugefügt wurde, statt als separate Lösung.

Als weitere wichtige Frage sollte geklärt werden, ob die Absättigung der Kaolinoberfläche mit Protamin und die evtl. daraus folgende Störung der Kontaktaktivierung für die Gerinnungshemmung höherer Protaminsulfatkonzentrationen (siehe bei 3.1.3) verantwortlich ist.

3.5.3.2 Versuchsbeschreibung

Für die Herstellung eines Kaolin-Protamin-Komplexes wurde in folgenden Schritten vorgegangen:

- Das Kaolin von je 0,5 ml Kaolinsuspension (5 mg/ml, aus dem PTT-Reagens) wurde abzentrifugiert.
- Der Kaolinniederschlag wurde mit je 0,5 ml DBA-Puffer pH 7,6 und 0,5 ml Protaminsulfatlösung aufgeschüttelt und 10 min

im Rüttler gemischt.

- Das Kaolin wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand verwahrt für die Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad-Reagens (siehe bei 3.5.2.2).
- Der Niederschlag (Kaolin-Protamin-Komplex) wurde zweimal mit je einem Milliliter Puffer gewaschen.
- Nach der letzten Zentrifugation wurde der Niederschlag endgültig in 0,5 ml Puffer aufgeschwemmt und diese Kaolin-Protamin-Suspension als Kontaktaktivator im PTT-Test nach 2.1.1 verwendet.

Als Protaminsulfatlösungen, mit denen das Kaolin versetzt wurde, dienten fünf Lösungen mit Konzentrationen von 25 µg/ml bis 1000 µg/ml, deren Werte auf der Abszisse von Abb. 15 aufgetragen sind.

Die PTT wurde nach diesem Schema durchgeführt:

im Plastikröhrchen bei 37°C:

0,1 ml Faktor VIII-Mangelplasma oder Normalplasma

0,1 ml Phospholipidlösung (aus dem PTT-Reagens)

0,1 ml Kaolin-Protamin-Lösung

nach 3 min Inkubation bei 37°C

0,1 ml 0,025 Mol/l CaCl_2 -Lösung von 37°C

3.5.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Abb. 15 stellt dar, ganz in Analogie zu Abb.5, daß auch durch eine bestimmte Menge Protamin, das an Kaolin gebunden ist, eine Normalisierung der Gerinnungszeiten von Faktor VIII-Mangelplasma

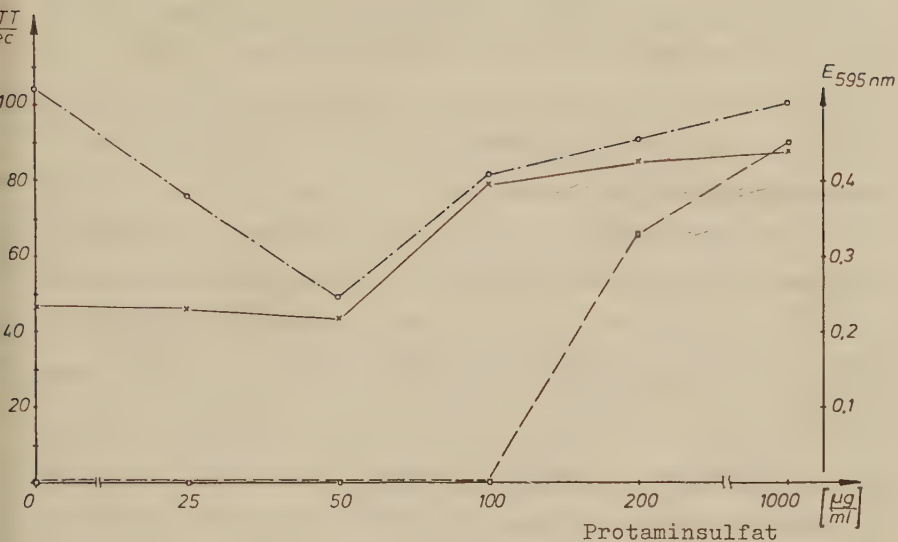


Abb. 15 Wirkung von Protaminsulfat auf F VIII-Mangelplasma bei Zugabe von Protaminsulfat, das an Kaolin adsorbiert ist

- x— Standard-Normalplasma
- F VIII-Mangelplasma
- Extinktionsverlauf des Proteinassays

möglich ist. Die PTT des Mangelplasmas verkürzte sich von 104 sec auf 50 sec, während sich die Zeiten des Normalplasmas in diesem Bereich nicht nennenswert ändern. Im Bereich der Gerinnungshemmung verhalten sich dann beide Plasmen gleich. Wieder sei auf die Ähnlichkeit des Verlaufes auf Abb. 5 hingewiesen.

Im Gegensatz zum Versuch, dessen Ergebnis auf Abb. 5 dargestellt ist, zeigt sich aber keine Ungerinnbarkeit der Proben bei Prot-

aminsulfatkonzentrationen, die 300 µg/ml übersteigen. Wird das Kaolin mit der hohen Konzentration an Protaminsulfat von 1000 µg/ml abgesättigt, so wird für das Faktor VIII-Mangelplasma lediglich wieder der Pufferleerwert erreicht; für das Normalplasma aber eine PTT-Verlängerung von 40 sec.

Besonders bemerkenswert ist hierbei die Beobachtung, daß eine Verlängerung der Gerinnungszeiten von Faktor VIII-Mangelplasma - im Gegensatz zum Normalplasma - nicht eintritt. Es wird lediglich eine vorher herbeigeführte Normalisierung wieder rückgängig gemacht.

Aus den Arbeiten von NOSSEL et al. (119,121) geht hervor, daß durch Protaminsulfat und andere positiv geladene Moleküle in bestimmten Konzentrationen eine Hemmung der Kaolin-Kontaktaktivierung eintritt. Das stimmt mit den Ergebnissen dieses Versuches überein, wobei jedoch zu betonen ist, daß eine vollständige Hemmung der Gerinnungsauslösung so nicht zu erreichen ist.

Zur gerinnungshemmenden Wirkung des Protaminsulfates siehe auch bei 3.7.3 .

Die Ergebnisse des Protein-Assays lassen erkennen, daß nur bei Zugabe von Protaminsulfatlösungen, die stärker konzentriert sind als 100 µg/ml, im Kaolinüberstand (siehe Versuchsbeschreibung) noch Protamin nachzuweisen ist. Das heißt aber, die unter dieser Konzentration liegenden Protaminmengen müssen vom Kaolin gebunden worden sein.

Die Ergebnisse der Gerinnungstests schließen ein Wegwaschen des gebundenen Protamins aus, so daß die Feststellung berechtigt ist, bei Durchführung der PTT mit einem definierten Kaolin-Protamin-Komplex lasse sich Faktor VIII-Mangelplasma nicht von Normalplasma unterscheiden.

3.5.4 Die Testung verschiedener Produkte der Kontaktphase

3.5.4.1 Fragestellung

Wie schon im Kapitel 3.5.1.1 beschrieben, beinhaltet die Kontaktaktivierung durch Kaolin die Formation der enzymatischen Aktivitäten Faktor XIIa und Kallikrein unter der Mitwirkung von hochmolekularem (HMW)-Kininogen.

Nach REVAK et al. (114) bleibt nach abgeschlossener Aktivierung diejenige molekulare Form des Faktors XIIa, die den Faktor XI aktivieren kann und der Faktor XI selbst an die Kaolinoberfläche adsorbiert. Hingegen wird Kallikrein und ein enzymatisch aktives Fragment des Faktors XII in die Lösung freigesetzt.

Zur Charakterisierung der Kontaktphase und um festzustellen, ob durch Protaminsulfat aktives Enzym (gemeint ist vor allem Faktor XIIa und Faktor XIa, evtl. in modifizierter Form) aus der Bindung an Kaolin freigesetzt wird und so unmittelbar den Faktor X aktivieren könnte, wurde die folgende Versuchsanordnung gewählt:

3.5.4.2 Versuchsbeschreibung

- Je 0,5 ml Faktor VIII-Mangelplasma wurden zusammen mit 0,5 ml Kaolinsuspension (5 mg/ml) 10 min im Rüttler gemischt;
- das Kaolin mit adsorbierten Anteilen wurde abzentrifugiert und der Überstand als Kontaktprodukt I (Kp I) verwendet;
- der abzentrifugierte Kaolin-Komplex wurde dreimal mit je 1 ml Puffer gewaschen; nach der letzten Zentrifugation wurde der Niederschlag:

1.) aufgeschwemmt in 0,5 ml Puffer (Kp II)

2.) aufgeschwemmt in 0,5 ml Protaminsulfatlösung der Konzentration 50 µg/ml, 10 min geschüttelt, zentrifugiert; der Überstand davon könnte durch Protamin vom Kaolin verdrängte enzymatische Aktivitäten aufweisen und wird hier als Kontaktprodukt III (Kp III) bezeichnet.

- Der bei 2.) erhaltene Niederschlag wurde zweimal gewaschen und anschließend aufgeschüttelt in 0,5 ml Puffer als Kontaktprodukt IV (Kp IV) verwendet.

Der Puffer war Diäthylbarbiturat-Acetat (DBA) -Puffer, pH 7,6. Die Messung der PTT von Faktor VIII-Mangelplasma und Normalplasma erfolgte genau wie bei 3.5.3.2 beschrieben. Dabei wurden jeweils die Kontaktprodukte I bis IV auf ihre Wirkung hin untersucht.

3.5.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Eine Angleichung der Gerinnungszeit von Faktor VIII-Mangelplasma an die des Normalplasmas findet sich nur bei Kontaktprodukt IV. Kp IV ist aber nichts anderes als ein Komplex aus Kaolin und Protamin mit zusätzlich adsorbierten Plasmakomponenten.

Die Ergebnisse von Abschnitt 3.5.3.3 werden durch diese Testanordnung also bestätigt, und es läßt sich schließen, daß Protaminsulfat seine gerinnungsverkürzende Wirkung entfaltet, während es an Kaolin gebunden ist.

Die Testung von Kp III zeigt allgemein einen schwachen akti-

Plasma	Zusätze	Zeit bis zum Rekalzifizieren (Inkubationszeit)		Gerinnungszeiten in s e c
		180 sec	300 sec	
St.Pl.	PL	151	—	
M VIII	+ Kp I	300	—	
St.Pl.	PL	55,4	—	
M VIII	+ Kp II	129	—	
St.Pl.	PL	115	—	
M VIII	+ Kp III	210	—	
St.Pl.	PL	48,1	45,8	
M VIII	+ Kp IV	55,8	46,5	
St.Pl.	PL	195	—	
M VIII	+ Puffer	300	—	

Tab. 5 Effekte verschiedener Produkte der Kontaktphase der Gerinnung (Kp) auf Normalplasma und Faktor VIII-Mangelplasma

Über die Bedeutung von Kp I - Kp IV : siehe Text

St.Pl. : Standard-Normalplasma

M VIII : Faktor VIII-Mangelplasma

PL : Phospholipidzusatz

vierenden Effekt auf den Test, bei einem Unterschied der Gerinnungszeiten von Faktor VIII-Mangelplasma und Normalplasma von fast 100 sec. Es kann also nicht angenommen werden, daß durch den Einfluß von Protamin eine enzymatische Aktivität vom Kaolin in die Lösung übergeht, die danach einen Kurzschluß der Faktor VIII- und -IX-Aktivität in der Gerinnungskaskade bewirkt.

Im Teil 3.4.2.3 wurden Erklärungsmöglichkeiten für den Protaminsulfateffekt aufgeführt. Durch die Unwirksamkeit von Kp III ist die Möglichkeit 3.) ausgeschlossen (Hypothese, daß aktiver Faktor XII vom Kaolin verdrängt wird und Faktor VIII und -IX umgeht).

Kontaktprodukt I (Überstand von mit Kaolin versetzten Plasmen) hat nur eine sehr schwache gerinnungsfördernde Wirkung, die sich auch nur bei Normalplasma zeigt. Das ist in Einklang mit REVAK et al. (114) und THOMSON et al. (116); denn die in der Gerinnungsauslösung aktiven Enzyme Faktor XIIa und Faktor XIa sind durch ihre Kaolinbindung entfernt. Kallikrein allein und ein Fragment des Faktors XII, das nur Präkallikrein aktivieren kann - beide sind in Kp I zu erwarten - vermögen keine deutliche Gerinnungsaktivität in diesem System zu entfalten.

Kaolin mit adsorbierten Kontaktphasenaktivatoren (Kp II) führt zu Gerinnungszeiten, die geringfügig länger sind als bei der Durchführung des Testes nur mit Kaolin (das entspräche einer üblichen PTT). Da sich am Kaolin adsorbiert Proteine, auf jeden Fall die genannten Faktoren XIIa und XIa, befinden, könnte dadurch eine Hemmung der Kontaktaktivierung des Plasmas verursacht und die geringfügig längeren Zeiten erklärt sein.

Eine Hemmung der Kontaktaktivierung durch Plasmaproteine ist bekannt (122).

3.6 Die Bedeutung des Faktors VII für den Protamin- sulfateffekt

- Versuche mit immunologisch erzeugten Mangelplasmen -

3.6.1 Fragestellung

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß Faktor VIII- und Faktor IX-Aktivität durch Protaminsulfat und Polylysin ersetzt werden kann. Für diese Substitution ist Kaolin, Faktor XII und Fletcher-Faktor erforderlich.

ALTMAN und HEMKER (123) beschrieben einen aktivierenden Einfluß der Kontaktaktivierung der Gerinnung auf das exogene Blutgerinnungssystem.

RADCLIFFE et al. (32) und KISIEL et al. (33) konnten zeigen, daß boviner Faktor VII durch Faktor XIIa in eine aktive, zweikettige Form übergeführt wird. Für die Messung der Aktivitätssteigerung, die etwa 30fach war, von Faktor VII im Gerinnungstest war jedoch Gewebsthromboplastin nach wie vor erforderlich (33).

Es wäre also an die Möglichkeit zu denken, daß aktivierter Faktor VII mit Protamin als vermittelndem Faktor den Faktor X aktiviert und so ein Kurzschluß der Faktoren VIII und IX erreicht wird. Die Bedeutung des Faktors VII könnte ermittelt werden, wenn eine Protaminsulfatkorrektur von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma, das gleichzeitig einen Mangel an Faktor VII aufweist, versucht würde.

3.6.2 Versuchsbeschreibung

Um einen kombinierten Mangel an Faktor IX und Faktor VII zu

erzielen, konnte entweder von einem natürlichen Faktor VII-Mangelplasma oder einem Faktor IX-Mangelplasma ausgegangen werden, wobei dann jeweils der andere Faktor immunologisch entfernt werden müßte.

Kommerzielle Antiseren gegen Faktor IX und Faktor VII waren erhältlich (siehe bei 2.1.4). Zu diesen Antiseren ist jeweils angegeben, wieviel Einheiten eines Faktors durch 1 ml des Antiserums neutralisiert werden. Laut Herstellerangaben sind sämtliche Gerinnungsfaktoren in den Antiseren durch bestimmte Verfahren inaktiviert worden.

Das Faktor IX-Antiserum wies 26 Neutralisationseinheiten auf, das Faktor VII-Antiserum 13. Um einen künstlichen Mangel an Faktor IX zu erhalten, wurde jeweils 1 ml Plasma mit 35 µl Antiserum für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsgemisch für 10 min bei 1500 x g zentrifugiert und die Faktor IX-Restaktivität darin bestimmt.

Sollte ein künstlicher Mangel an Faktor VII erhalten werden, so wurde 1 ml Plasma mit 200 µl Antiserum inkubiert. Für das weitere Vorgehen gilt dasselbe wie für künstliches Faktor IX-Mangelplasma. Zu jedem Plasma wurde vor und nach Antiserumeinwirkung die Aktivität der Faktoren VII und IX bestimmt.

Um den Effekt der polykationischen Verbindungen zu überprüfen, wurde die PTT mit den optimalen Konzentrationen an Protaminsulfat und Polylysin von 100 µg/ml bestimmt (PTT wie bei 2.1.1 beschrieben).

In der folgenden Übersicht sind die auf die hier beschriebene Art erzeugten Mangelplasmen zusammengefaßt:

1.)	St.Pl.	$\xrightarrow{\text{Anti-F IX}}$	KM IX
2.)	M VII	$\xrightarrow{\text{Anti-F IX}}$	M VII + KM IX
3.)	M VIII	$\xrightarrow{\text{Anti-F IX}}$	M VIII + KM IX
4.)	M VIII	$\xrightarrow{\text{Anti-F VII}}$	M VIII + KM VII
5.)	M IX	$\xrightarrow{\text{Anti-F VII}}$	M IX + KM VII

M : Natürlicher Mangel eines Gerinnungsfaktors

KM : Künstlicher Faktorenmangel, durch Antikörper-
wirkung erhalten

St.Pl. : Standard-Normalplasma

3.6.3 Ergebnisse und Diskussion

In Tab. 6 sind die Ergebnisse des Versuches zusammengefaßt.

Die erste Zeile zeigt zunächst, daß durch die Antikörperwirkung auf Normalplasma dessen Faktor IX-Aktivität von 0,85 U/ml auf 0,05 U/ml reduziert wurde. Die dadurch hervorgerufene Verlängerung der PTT von 49,6 sec auf 89,6 sec konnte auch in diesem Fall durch Protaminsulfat wieder normalisiert werden; mit Polylisin ergab sich eine deutliche Verkürzung auf 77,4 sec.

Bei dem natürlichen Faktor VII-Mangelplasma (2. Zeile) konnte die PTT durch Faktor IX-Antiserum von 53,9 sec auf 119 sec verlängert werden. Durch Protaminsulfat konnte danach wieder eine Normalisierung noch unter die Zeit des Ausgangswertes erzielt werden. Diese Korrektur ist mit höchster Wahrscheinlichkeit ohne eine Beteiligung von Faktor VII zustande gekommen, denn es ist nicht anzunehmen, daß evtl. vorhandene Faktor VII-Restaktivitäten

Ausgangs plasma	Vor Antiserumeinwirkung						Anti-serum	Nach Antiserumeinwirkung					
	FVIII U/ml	FIXC U/ml	FVIII/FIXC	+Puffer PTT sec	+Prot.S. PTT sec	+Polyl. PTT sec		FVIII U/ml	FIXC U/ml	FVIII/FIXC	+Puffer PTT sec	+Prot.S. PTT sec	+Polyl. PTT sec
St.Pl.	0,8	0,85	0,9	49,6	54,2	45,0	AntiFIX	0,8	0,05	0,9	89,6	51,7	77,4
M VII	---	0,7	0,01	53,9	---	---	AntiFIX	---	0,03	0,01	119,0	45,9	---
M VIII	0,01	0,6	0,2	106,5	47,4	83,4	AntiFIX	0,01	0,3	0,9	123,3	49,4	96,9
M VIII	0,01	0,6	0,9	106,5	47,4	83,4	AntiFVII	0,01	0,6	0,01	109,1	46,6	83,5
M IX	---	0,01	1,0	139,5	66,5	78,2	AntiFVII	---	0,01	0,01	135,4	64,1	79,9

Tab. 6 Verkürzung der partiellen Thromboplastinzeit durch Protaminsulfat und Polylysin von Mangelplasmen, die durch immunologische Behandlung von Mangelplasmen erhalten wurden

M : kongenitales Mangelplasma
 St.Pl. : Standard-Normalplasma
 AntiFIX/ : heterologes Antiserum gegen humanen Faktor IX bzw. VII
 AntiFVII : Gerinnungsaktivitäten der Faktoren VIII, IX und VII
 FVIII/ :
 FIXC/
 FVIII

eine derartige, unverändert hohe Gerinnungszeitverkürzung bewirken können.

In Zeile 5 ergibt sich die Konstellation eines natürlichen Faktor IX-Mangelplasmas mit einem künstlichen Faktor VII-Mangel. Die Aktivität beider Faktoren ist kleiner als 0,01 U/ml. Trotz des hinzugekommenen Faktor VII-Mangels kann die PTT des Plasmas in gleicher Weise wie vorher durch Protaminsulfat und Polylysin verkürzt werden.

Es wurde auch von einem natürlichen Faktor VIII-Mangelplasma ausgegangen. Die Zeilen 3 und 4 zeigen, daß auch mit zusätzlichem Faktor IX-bzw. Faktor VII-Mangel die PTT dieses Plasmas in gleicher Weise wie vorher durch die polykationischen Verbindungen korrigierend beeinflußt wird.

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß für die Korrektur von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma durch Protaminsulfat eine Beteiligung von Faktor VII nicht erforderlich ist.

Die Korrektur ist bei kombiniertem Faktor VIII- und Faktor IX-Mangel genauso ausgeprägt wie bei einfachem Mangel. Daher muß definitiv angenommen werden, daß beide Aktivitäten oder deren Interaktion für den Protaminsulfateffekt nicht erforderlich sind. In Übereinstimmung mit Abschnitt 3.2.3 kann auch unterstellt werden, daß selbst ein in den üblichen Gerinnungstesten inaktives Faktor IX-Molekül, als Träger enzymatischer Aktivität, nicht benötigt wird. Denn durch die Komplexbildung mit den Immunglobulinen und anschließende Zentrifugation wurde das Faktor IX-Molekül aus dem Plasma entfernt.

Der Protaminsulfateffekt ist also nicht an die Anwesenheit eines Defektmoleküls oder eine spezifische Konstellation in kongenitalen Mangelplasmen gebunden, sondern es ist die enzymatische Aktivität des Faktors IX und ihr Co-Faktor (Faktor VIII) in diese Reaktion überhaupt nicht einbezogen.

3.7 Das Bindungsvermögen von Protamin-Sepharose für verschiedene Gerinnungsfaktoren

3.7.1 Fragestellung

Durch Protamin, das durch Bindung an ein hochmolekulares Dextran-Gel immobilisiert ist, besteht die Möglichkeit, die Affinität der verschiedenen Gerinnungsfaktoren zum Protamin festzustellen.

Aufgrund seiner starken positiven Ladung wird Protamin sicherlich mit den anionischen Regionen vieler Proteine und Glykoproteine reagieren. Eine besonders starke Affinität besteht zu dem Glykosaminoglykan Heparin; eine Affinität, die so ausgeprägt ist, daß Heparin durch Protamin aus seinem spezifischen Komplex, dem Heparin-Antithrombin-III-Komplex, entfernt wird (124).

Wegen dieser Komplexbildungsfähigkeit mit Heparin wird Protaminsulfat klinisch zur Antagonisierung der Heparinwirkung häufig angewendet (91).

Deshalb, und um weitere Hinweise zur Deutung des Protaminsulfat-effektes auf Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasma zu bekommen, sollte das Bindungsvermögen von Protamin-Sepharose für die klassischen Gerinnungsfaktoren ermittelt werden.

3.7.2 Versuchsbeschreibung

Die Protamin-Sepharose wurde hergestellt und für Testzwecke vorbereitet wie unter 2.3 beschrieben.

Als Ausgangsplasma diente Standard-Normalplasma mit deklariertem Faktorengehalt der Behringwerke.

Mit diesem Plasma wurde für jeden nach 2.1.3 getesteten Faktor eine Eichkurve erstellt.

Die Adsorption des Plasmas mit Protamin-Sepharose erfolgte nach dem hier aufgeführten Schema:

1,2 ml Standard-Normalplasma und

0,6 ml Protamin-Sepharose oder Sepharose (2/3 der Suspension ist sedimentierbarer Anteil)

- beides 5 min im Rüttler mischen
- Protamin-Sepharose oder Sepharose abzentrifugieren in 10 min bei 1500 x g
- Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren im Überstand bestimmen

Jedes Plasma wurde zur Kontrolle auch mit nativer Sepharose versetzt. Dadurch konnte eindeutig festgestellt werden, daß nur das gebundene Protamin für die Adsorption einiger Gerinnungsfaktoren verantwortlich ist. Andererseits ergab sich so die Möglichkeit einer Verdünnungskorrektur:

Durch die unterschiedlichen Molekulargewichte der einzelnen Gerinnungsfaktoren waren auch verschiedene Verdünnungsfaktoren durch den Zusatz der (Protamin-)Sepharose zum Plasma zu erwarten. Der Verdünnungsfaktor ergibt sich dann als Quotient der Aktivität des jeweiligen Gerinnungsfaktors im Ausgangsplasma zu der Aktivität im Überstand des mit Sepharose versetzten Plasmas. Wenn nun die Aktivitäten im Überstand von Protamin-Sepharose mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, so zeigt sich, welcher Anteil eines Gerinnungsfaktors an Protamin gebunden wurde.

Eine Abgrenzung der Bindung an Protamin von dem reinen Verdünnungseffekt als verantwortliche Ursachen für eine Aktivitätsabnahme war also möglich.

3.7.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse des Versuches sind in Tab. 7 aufgeschlüsselt. Dabei ist vor allem die letzte Spalte interessant, die zeigt, wieviel Prozent der ursprünglichen Aktivität eines Faktors nach der Adsorption mit Protamin-Sepharose noch im Überstandsplasma vorhanden ist. Zur besseren Veranschaulichung sind diese Prozentsätze in Abb. 16 als Stabdiagramm dargestellt.

Es ergibt sich für die Vitamin-K-abhängigen Faktoren II, X, IX und VII eine Reduktion auf ca. 10%. Die Faktoren VIII und XII werden auf etwa 60% reduziert, während die Faktoren V und XI überhaupt nicht bzw. nur minimal an Protamin gebunden werden.

Da für das Faktor VIII assoziierte Protein (F VIIIIR:AG) und für das Faktor IX-Antigen (F IX:AG) Antiseren verfügbar waren, wurden mittels Laurell-Immunelektrophorese auch diese beiden Antigene, - als Stellvertreter für zwei unterschiedliche Gruppen von Gerinnungsfaktoren -, im Überstand von Protamin-Sepharose bestimmt (siehe auch Kapitel 3.9.3).

Es zeigt sich in Tab. 8 tatsächlich ein sehr differentes Verhalten der beiden Proteine. Das F IX:AG wird vollständig aus dem Plasma entfernt, während das F VIIIIR:AG überhaupt nicht gebunden wird. Im Gegensatz dazu wird vom F VIII :C 30% adsorbiert. Das ist aber nicht widersprüchlich, weil F VIII:C und F VIIIIR:AG keine

Gerinnungs- faktor	Gerinnungsaktivität in U/ml				Aktivität in Ü Prot.Seph. in % vom Ausgangspl.
	Ausg.- plasma	Ü Seph.	Ü Prot. Seph.	Ü Prot. Seph. korr.	
F II	0,9	0,68	0,036	0,048	5,3
F X	1,0	0,7	0,086	0,12	12,0
F IX	0,85	0,72	0,052	0,061	7,2
F VII	0,9	0,64	0,11	0,15	16,7
F VIII	0,8	0,6	0,41	0,55	68,8
F V	1,0	0,78	0,78	1,0	100,0
F XII	1,0	0,7	0,4	0,57	57,0
F XI	1,0	0,8	0,76	0,95	95,0

Tab. 7 Aktivitäten verschiedener Gerinnungsfaktoren
im Plasma, das mit Protamin-Sepharose
behandelt wurde

Ü Seph. : Überstand von Sepharose-behandeltem
Plasma

Ü Prot. : Überstand von mit Protamin-Sepharose
Seph. behandeltem Plasma

Ü Prot. : Ü Prot.Seph. mit Korrektur des Ver-
Seph. dünnungseffektes
korr.

molekulare Einheit darstellen (siehe dazu Abschnitt 1.3.1).

Von der Faktor IX-Aktivität finden sich noch 7% im Überstand,
aber kein meßbares Antigen. Das könnte daran liegen, daß Spuren
des Faktor IX-Moleküls, die jenseits der Empfindlichkeitsgrenze
der immunologischen Bestimmungsmethode liegen, für diese Akti-
vität bereits ausreichen.

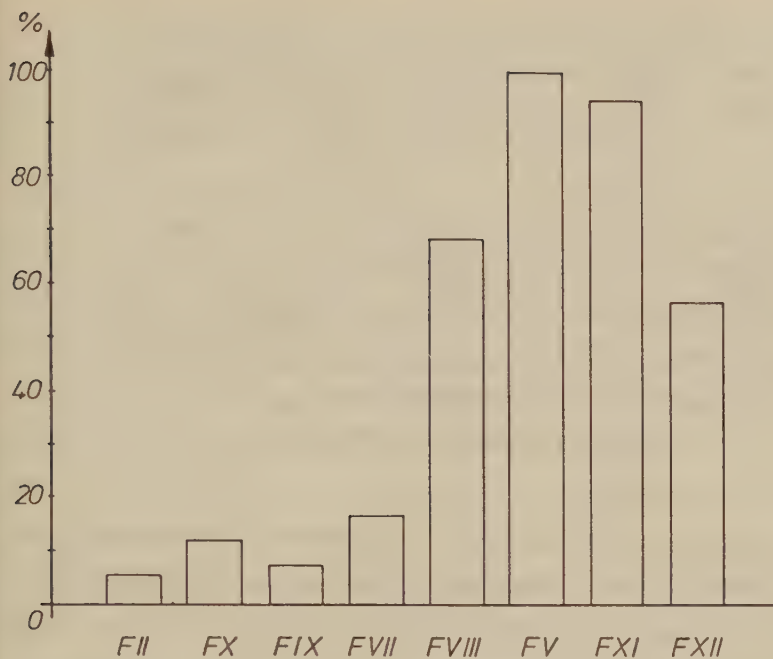


Abb. 16 Die Aktivitäten verschiedener Gerinnungsfaktoren im Überstand von Plasma, das mit Protamin-Sepharose behandelt worden ist

Angabe der Aktivitäten in Prozent der Aktivitäten des nicht adsorbierten Plasmas

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine starke Affinität der Faktoren II, X, IX und VII zum Protamin besteht.

Man kann spekulieren, daß diese Faktoren über ihre spezifischen γ -Carboxy-Glutamyl-Reste an positiv geladene Arginyl-Reste des Protamins gebunden werden. Die Blockierung dieser Gruppen an den Vitamin-K-abhängigen Faktoren könnte für die seit langer Zeit bekannte gerinnungshemmende Wirkung des Protaminsulfates verantwortlich sein.

Faktor- Antigen	Antigenkonzentration in U/ml				Antigen in Ü Prot.Seph. in % vom Ausgangspl.
	Ausg.- plasma	Ü Seph.	Ü Prot. Seph.	Ü Prot. Seph. korr.	
F VIII:R:AG	0,51	0,4	0,4	0,51	100
F IX:AG	0,75	0,58	0	0	0

Tab. 8 Unterschiedliche Adsorption von F VIII:R:AG
und F IX AG an Protamin-Sepharose
Zeichenerklärung siehe Tab. 7

Eine Blockierung der γ -Carboxy-Glutamyl-Reste am N-Terminus der o.g. Faktoren führt zu einer Störung der Bildung von Lipid-abhängigen Aktivatorkomplexen (siehe dazu auch bei 1.2.2).

Diese biochemisch definierten - wenn auch noch nicht genau erforschten - Aktivatorkomplexe sind analog zu der früheren Bezeichnung "Thromboplastin".

Die hier beschriebene Deutung der Gerinnungshemmung durch Protaminsulfat befindet sich insoweit in Übereinstimmung mit den Befunden von HOUGIE (117), der zeigen konnte, daß Protaminsulfat die PTT, die Thromboplastinzeit (Einphasen-Prothrombinzeit) und die Substratgerinnungszeit des Thromboplastingenerationstests (125) bei steigender Konzentration stetig verlängerte.

Die Gerinnungsverzögerung im letztgenannten Test ergab sich bezeichnenderweise jedoch nicht, wenn das Protaminsulfat zum Testsystem hinzugefügt wurde, nachdem die Thromboplastinformation abgeschlossen war.

3.8 Bestimmung von Heparin in Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasmen

3.8.1 Fragestellung

Wegen der bekannten heparinneutralisierenden Wirkung des Protaminsulfates (91,124) und weil die molekularen Grundlagen besonders des Faktor VIII-Aktivitätsmangels der Hämophilie A, aber auch des Faktor IX-Aktivitätsmangels der Hämophilie B, bislang nicht genau geklärt sind (siehe dazu unter 1.3), ist auch an eine an die Faktoren VIII und IX gekoppelte heparinneutralisierende Wirkung zu denken.

Ein Faktorendefekt könnte dann über einen verstärkten Einfluß von Heparin oder heparinartigen Substanzen zur Gerinnungsverzögerung führen. Diese Störung könnte natürlich durch Protaminsulfat kompensiert werden.

3.8.2 Versuchsbeschreibung

Es wurden drei Faktor VIII-Mangelplasmen und ein Faktor IX-Mangelplasma im Anti-Faktor-Xa-Test nach Kapitel 2.5 auf ihren Heparin Gehalt untersucht. Dazu wurde zunächst eine Eichkurve mit Normalplasma, dem variable Mengen Heparin zugesetzt wurden, erstellt.

3.8.3 Ergebnisse und Diskussion

Abb. 17 verdeutlicht, daß eine negative Korrelation der Heparinkonzentration im Normalplasma zu der Menge des freigesetzten p-Nitroanilins und damit der Extinktion bei 405 nm besteht.

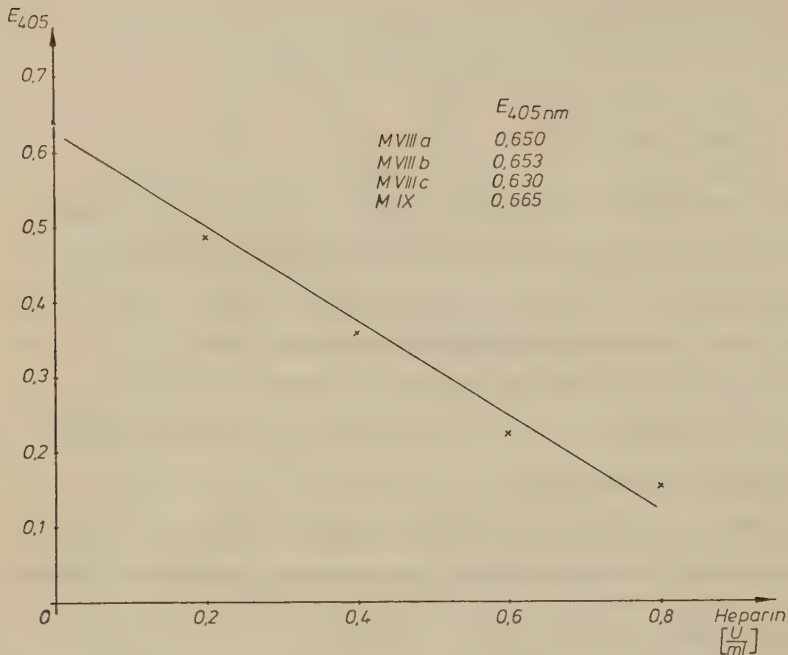


Abb. 17 Standardgerade für Heparin im Plasma,
gemessen mit dem Anti-F Xa-Test
Die Extinktionswerte bei 405nm (E_{405}) von vier
Mangelplasmen (M VIII/IX) sind eingefügt

Die drei getesteten Faktor VIII-Mangelplasmen und das Faktor IX-Mangelplasma weisen keine mit diesem Testsystem feststellbare Heparinaktivität auf. Sie unterscheiden sich in ihren Meßwerten nicht erwähnenswert von nativem Normal-Poolplasma.

Eine Erklärung der Korrektur von Faktor VIII- und -IX-Mangelplasma durch Protaminsulfat ist demnach nicht über eine gesteigerte Heparinaktivität dieser Plasmen möglich.

3.9 Immunelektrophoretische Bestimmung von F VIIIIR:AG
und F IX:AG und ihr Verhalten unter Protaminsulfat-
einfluß

3.9.1 Fragestellung

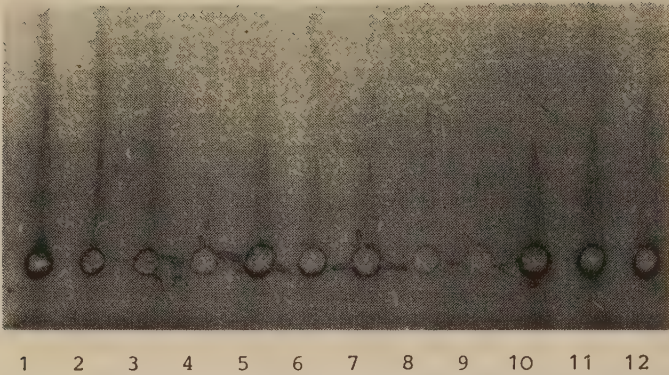
Die Gründe für die quantitative Bestimmung des F VIIIIR:AG und des F IX:AG sind in den Kapiteln aufgeführt, in denen diese Bestimmungen verwendet wurden.

Da die Gerinnungsaktivität des Faktors VIII (F VIIIIC) keine Eigenschaft des F VIIIIR:AG ist, wäre es konsequent gewesen, das F VIIIC:AG zu ermitteln. In neuester Zeit ist dafür ein Radio-Immunoassay beschrieben worden (70); eine Messung in der Laurell-Elektrophorese ist aber wegen der geringen Konzentration und der mangelnden Präzipitierbarkeit des F VIIIC:AG mit seinem Antikörper nicht möglich.

Weiterhin sollte der Einfluß von Protaminsulfat auf die elektrophoretische Wanderung von F VIIIIR:AG und F IX:AG festgestellt werden.

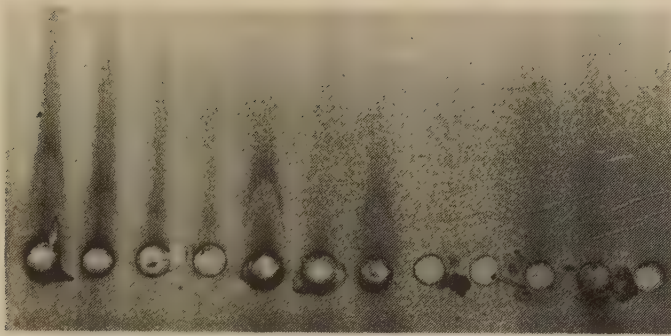
3.9.2 Versuchsbeschreibung

Die Methode der quantitativen Immunelektrophorese nach LAURELL und die zweidimensionale Immunelektrophorese sind in Kapitel 2.2 beschrieben.



- 1 : Normal-Poolplasma unverdünnt
2 : Normal-Poolplasma 1:2 verdünnt
3 : Normal-Poolplasma 1:4 verdünnt
4 : Normal-Poolplasma 1:8 verdünnt
5 : Standard-Plasma
6 : Überstand von Protamin-Sephärose vom Standard-Plasma
7 : Überstand von Sephärose vom Standard-Plasma
8 : Faktor VIII reinst 54 U/ml 1:100 verdünnt
9 : Überstand von Protamin-Sephärose vom Faktor VIII reinst
1:100 verdünnt
10 : Faktor VIII-Mangelplasma "a"
11 : Faktor VIII-Mangelplasma "b"
12 : Faktor VIII-Mangelplasma "c"

Abb. 18 Bestimmung des F VIII R:AG mit der Laurell-Immunelektrophorese. Die Proben 5, 6, 7 beziehen sich auf Kapitel 3.7.3; die Proben 10, 11, 12 auf Abschnitt 3.2.3



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

- 1 : Normal-Poolplasma unverdünnt
2 : Normal-Poolplasma 1:2 verdünnt
3 : Normal-Poolplasma 1:4 verdünnt
4 : Normal-Poolplasma 1:8 verdünnt
5 : Standard-Plasma
6 : Überstand von Protamin-Sepharose vom Standard-Plasma
7 : Überstand von Sepharose vom Standard-Plasma
8 : Faktor VIII reinst 54 U/ml 1:100 verdünnt
9 : wie 8
10 : Faktor IX-Mangelplasma "a"
11 : Faktor IX-Mangelplasma "b"
12 : wie 10

Abb. 19 Bestimmung des F IX:AG mit der Laurell-Immunelektrophorese. Die Proben 5, 6, 7 beziehen sich auf Kapitel 3.7.3; die Proben 10, 11, 12 auf Abschnitt 3.2.3

3.9.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Immunpräzipitate der F VIII:R:AG-Bestimmung sind in Abb. 18 dargestellt.

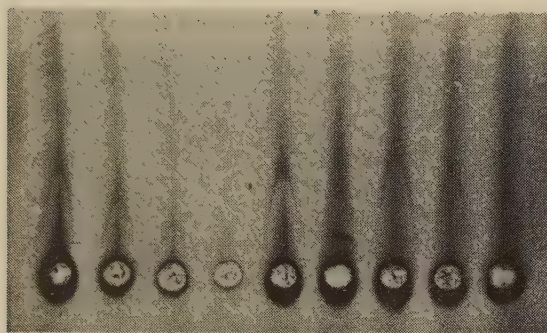
Es zeigt sich dabei die zuerst von ZIMMERMAN et al. (46) beschriebene Tatsache, daß Hämophile ein Faktor VIII-assoziertes Protein in normalen Mengen aufweisen (Proben: 10, 11, 12 - siehe auch 3.2.3, Tab. 4).

Die Proben 5, 6 und 7 beziehen sich auf den Abschnitt 3.7.3 . Es läßt sich kein Unterschied in der Höhe der Präzipitate 6 und 7 feststellen, was bedeutet, daß kein F VIII:R:AG an die Protamin-Sepharose gekoppelt wurde. Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich der Proben 5, 6 und 7 der Abb. 19 eine vollständige Entfernung des F IX:AG aus dem Ansatz an. Über Loch Nr. 6, in das der Überstand der Protamin-Sepharose pipettiert wurde, hat sich kein Immunpräzipitat formiert.

Von den beiden eingesetzten Faktor IX-Mangelplasmen (Proben 10 und 11) findet sich lediglich über Mangelplasma "b" ein schwaches Präzipitat, das mit einer Konzentration des F IX:AG von 0,27 U/ml korrespondiert (siehe auch bei 3.2.3, Tab. 4) .

Eine Heterogenität von Hämophilie-B-Plasmen ist beschrieben worden. PAREKH et al. (83) konnten in 50% der Fälle mittels der Laurell-Elektrophorese ein Defektprotein nachweisen (siehe dazu auch bei 1.3.2).

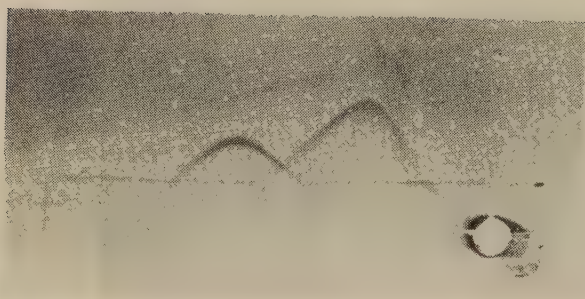
Nebenbei soll noch erwähnt werden, daß hochgereinigter Faktor VIII, gelöst in Puffer, von Protamin-Sepharose zu etwa 40% adsorbiert wird. Die entsprechenden Präzipitate 8 und 9 finden sich in Abb. 18.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1 : Standard-Plasma unverdünnt
- 2 : Standard-Plasma 1:2 verdünnt
- 3 : Standard-Plasma 1:4 verdünnt
- 4 : Standard-Plasma 1:8 verdünnt
- 5 : Standard-Plasma 10 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat enthaltend
- 6 : Standard-Plasma 100 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat enthaltend
- 7 : wie 1
- 8 : wie 5
- 9 : wie 6

Abb. 20 Bestimmung des F IX:AG mit der Laurell-Immunelektrophorese bei Einwirkung von Protaminsulfat



a) Standard-Plasma



b) Standard-Plasma mit 100 μ g/ml Protaminsulfat

Abb. 21 Die gleichzeitige, kombinierte Bestimmung von
F VIII:R:AG und F IX:AG mit der zweidimensionalen
Immunelektrophorese

Im Plasma, in dem Konkurrenzreaktionen vieler Proteine an den Protaminbindungsstellen stattfinden, zeigt sich dann keine nachweisbare Adsorption des F VIII R:AG mehr. Daß auch im gereinigten System nur eine Bindung von 40% stattfindet, verdeutlicht nur die geringe Affinität des F VIII R:AG zu Protamin.

In den Abbildungen 20 und 21 ist die Wirkung von Protaminsulfat auf das elektrophoretische Verhalten von F VIII R:AG und F IX:AG dargestellt. Dabei zeigt besonders deutlich der Vergleich der Präzipitate 7, 8 und 9 in Abb. 20, daß bei steigender Konzentration an Protaminsulfat die meßbare Antigenität des Faktors IX abnimmt. Bei der Protaminsulfatkonzentration von 100 µg/ml ist ein Präzipitat nicht mehr eindeutig zu identifizieren.

Eine gemeinsame Untersuchung von F VIII R:AG und F IX:AG, jeweils ohne und mit Protaminsulfatzusatz, war möglich in einem Agarose-Gel, das gleichzeitig Antiseren gegen beide Faktoren enthielt. In Abb. 21 a) ist die zweidimensionale Auftrennung von Standard-Plasma zu sehen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Proteine von rechts nach links in den Gelstreifen der ersten Dimension eingewandert sind. Die Wanderung des Faktors VIII ist wegen seines höheren Molekulargewichtes erwartungsgemäß langsamer.

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 21 b) die Veränderung unter Protaminsulfateinfluß:

Es ändert sich die Wanderungsstrecke und auch die meßbare Antigenität (Präzipitathöhe) des Faktors IX. Das F VIII R:AG bleibt unbeeinflußt.

Für die Erklärung der verlangsamten Wanderung des F IX:AG unter Protaminsulfateinfluß kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

- Durch Komplexbildung mit dem positiv geladenen Protamin nimmt die negative Nettoladung des Faktors IX ab und damit die Wanderung in Richtung Anode.
- Protaminsulfat führt zur Aggregatbildung mehrerer Faktor IX-Moleküle.

Die verminderte Antigenität kann erklärt werden über:

- die Maskierung antigener Determinanten durch Anlagerung von Protaminsulfat;
- die Veränderung der Antikörperbindungsstellen durch konformative Veränderung des Faktor IX-Moleküls nach Komplexierung mit Protaminsulfat.

Die in Abschnitt 3.7.3 erhaltenen Hinweise, Protaminsulfat habe eine besondere Affinität zu den Vitamin-K-abhängigen Faktoren, werden durch die Ergebnisse dieses Versuches unterstützt.

4. Zusammenfassung und abschließende Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, daß die Gerinnungszeiten von Faktor VIII- und Faktor IX-Mangelplasmen, gemessen mit der kaolinaktivierten partiellen Thromboplastinzeit, durch Protaminsulfat in der Konzentration von 100 µg/ml normalisiert werden können; Polylysin ist ebenfalls gerinnungsverkürzend wirksam.

Protaminsulfat in der o.g. Konzentration erwies sich bei Mangelplasmen der Faktoren II, X, XII, V, VII und Fletcher-Faktor als ineffektiv. Faktor XI-Mangelplasma konnte in geringem Ausmaß korrigiert werden.

Für die Wirkung ist die Anwesenheit von Kaolin erforderlich und es kann angenommen werden, daß Protamin eine enzymatische Aktivität in Faktor VIII-Mangelplasma erzeugt, während es an Kaolin gebunden ist.

Phospholipide sind für den Effekt als solchen nicht erforderlich, allerdings sind ohne Phospholipide im Ansatz die Gerinnungszeiten, genau wie bei Normalplasma, länger.

Da das Protaminsulfat auch in immunologisch erzeugten Faktor IX-Mangelplasmen und in natürlichem Faktor IX-Mangelplasma ohne nachweisbares Faktor IX-Molekül voll wirksam ist, kann vermutet werden, daß der bekannte endogene Faktor X-aktivierende Komplex nicht in die Reaktion einbezogen ist.

Der Kurzschluß des endogenen Faktor X-aktivierenden Komplexes wird nicht über den Faktor VII erreicht, da Protaminsulfat genauso wirksam in kombinierten Mangelplasmen der Faktoren VIII und VII sowie IX und VII ist.

In Versuchen mit an Sepharose immobilisiertem Protamin konnte eine ausgeprägte Affinität der Faktoren II, X, IX und VII zum Protamin nachgewiesen werden. Durch Adsorption von Normalplasma mit Protamin-Sepharose können die Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren auf Werte von etwa 10% reduziert werden.

Die lange bekannte gerinnungshemmende Wirkung des Protaminsulfates wird in dessen spezifischer Bindung an diese Faktoren gesehen und der sich daraus ergebenden Behinderung der Lipid- und Substratbindung.

Aufgrund der erhaltenen Resultate wird angenommen, daß Protaminsulfat eine funktionelle Kopplung des Faktors X an den Startphasenkomplex, bestehend aus Kaolin, Faktor XIIa, (Prä-)Kallikrein und hochmolekularem Kininogen ermöglicht.

Da Protaminsulfat Faktor X-Mangelplasma nicht korrigiert, kann auf die Notwendigkeit einer Anwesenheit und Aktivierung des Faktors X geschlossen werden. Als enzymatische Aktivitäten, die den Faktor X ohne Faktor IXa aktivieren könnten, kämen zwei Formen des Faktors XIIa [α -Faktor XIIa und β -Faktor XIIa (114)] und Kallikrein in Betracht.

In Abschnitt 3.5.4 wurde demonstriert, daß sich in einem Inkubationsgemisch aus Faktor VIII-Mangelplasma, Kaolin und Protaminsulfat, die mangelpasmakorrigierende Fraktion nicht im Überstand des abzentrifugierten Kaolinkomplexes befindet. Der Protaminsulfateffekt entsteht also nicht durch auf den Faktor X gerichtete enzymatische Aktivitäten im Kaolinüberstand. Solche Aktivitäten könnten entstanden sein durch eine Verdrängung von Enzymen aus der Oberflächenadsorption in die Lösung oder durch

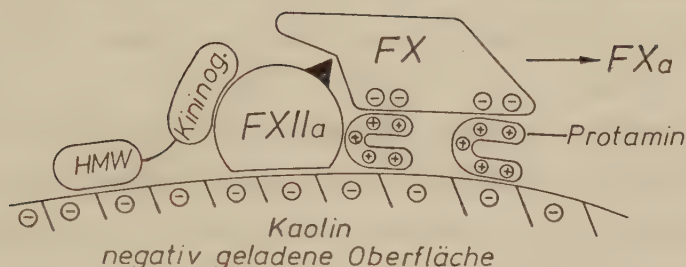


Abb. 22 Schematische Darstellung des hypothetischen Faktor X-aktivierenden Komplexes, der unter Protaminsulfateinfluß gebildet wird

Modifikation von Enzymen, die bereits in Lösung waren.

Die Rolle des Polykations Protamin in der Aktivierungsreaktion ist darin zu sehen, die Kopplung des Faktors X an sein an die negative Oberfläche des Kaolins adsorbiertes Enzym - Faktor XIIa oder Kallikrein - zu ermöglichen. Bei Mitwirkung der gelösten Enzyme β -Faktor XIIa und Kallikrein müßte eine Komplexbildung mit Oberflächenbindung der Faktoren β -Faktor XIIa/Kallikrein und Faktor X durch Protaminsulfat angenommen werden.

Mit größerer Wahrscheinlichkeit kommt aber der α -Faktor XIIa als Enzym in Frage, da er bereits oberflächengebunden ist (114).

Abb. 22 zeigt eine schematische Darstellung der molekularen Verhältnisse dieser Hypothese.

Die geringe aber deutliche Gerinnungsverbesserung von Faktor XI-Mangelplasma (siehe bei 3.2.3) spricht dafür, daß der Faktor XIa

nicht das in die Reaktion einbezogene Enzym ist. Wäre der Faktor XIa die auf den Faktor X gerichtete Protease, so müßte die Gerinnungsverkürzung von Faktor XI-Mangelplasma durch Protaminsulfat über evtl. darin enthaltene Restaktivitäten erklärt werden.

Nach FUJIKAWA et al. (10) und THOMPSON et al. (116) ist der Faktor XIa genauso wie Kallikrein zu einer reziproken Aktivierung des Faktors XII in der Lage. Die Möglichkeit erscheint daher wahrscheinlich, daß durch den Faktor XI-Mangel ein zusätzlicher Rückkopplungsmechanismus zur beschleunigten Faktor XII-Aktivierung wegfällt, daher weniger Faktor XIIa entsteht. Auf diese Weise ist die nicht vollständige Korrektur von Faktor XI-Mangelplasma zu verstehen.

Von GRAHAM und BARROW (89) wurde über die Korrektur von Faktor VIII-Mangelplasma durch Polyasparagin- und Polyglutaminsäure berichtet. Neben einer leichten Gerinnungsverkürzung von Faktor IX-Mangelplasma konnten alle anderen getesteten Mangelplasmen nicht beeinflußt werden. Es soll auf die folgenden Unterschiede zum Protaminsulfateffekt hingewiesen werden:

Bei den vorgenannten Verbindungen handelt es sich im Gegensatz zum Protamin um Polyanionen, deren Bindung an Kaolin nicht anzunehmen ist. Phospholipide sind hier unbedingt nötig, während der Protaminsulfateffekt auch bei Abwesenheit von Phospholipiden im Testansatz eintritt. Das spricht für den Angriff der Polyanionen in den Lipid-abhängigen Aktivatorkomplexen des endogenen Gerinnungssystems. Weiterhin ist für die Wirkung von Polyglutamin- und Polyasparaginsäure eine Kaolinaktivierung vor deren Zugabe

erforderlich. Für Protaminsulfat gilt das nicht; die Kaolinaktivierung der Startphase und die Protaminsulfataktivierung können parallel laufen.

Daß die von GRAHAM und BARROW angegebenen Befunde letztlich doch auf einem ähnlichen Mechanismus wie der Protaminsulfateffekt beruhen, kann nicht ausgeschlossen werden.

Alle angestellten Überlegungen wurden auf der Grundlage des anerkannten Gerinnungssystems mit seinen Faktoren unternommen.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß über die Aktivierung von Faktor X durch Protein M, ein Plasmaprotein, das sich ähnlich den Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren verhält, berichtet wurde (126):

Es ist daher durchaus in Erwägung zu ziehen, daß der Protaminsulfateffekt über Protein M oder irgend einen anderen, bislang nicht entdeckten Gerinnungsfaktor erfolgt, der einen by-pass des bekannten endogenen Faktor X-aktivierenden Komplexes ermöglicht.

Es kommt aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht in Frage, die therapeutische Anwendung von Protaminsulfat bei Hämophilie-Patienten zu erwägen; schon allein deshalb, weil die Anwesenheit von Kaolin für den beschriebenen in-vitro-Effekt Voraussetzung ist.

Bei der verwendeten kaolinaktivierten PTT handelt es sich um ein artefizielles System, das zwar in Gerinnungsuntersuchungen weit verbreitet ist, das aber auch die Frage offen läßt, welche Bedingungen in vivo den Start des endogenen Gerinnungssystems bewirken. Die in der Einleitung erwähnte Aktivierung des Faktors XII

durch Kollagen (4) ist nicht unwidersprochen geblieben (127,10). Ein neuerer Beitrag zum Problem der Aktivierung des endogenen Systems unter physiologischen Bedingungen stammt von FUJIKAWA et al. (10). Die Autoren beschreiben eine Faktor XII-Aktivierung sowie eine Aktivierung des Faktors XI durch den Faktor XII, wenn bestimmte Lipide im Testansatz anwesend sind. Die beschriebenen Lipide, die nicht identisch sind mit den Lipiden, die in spätere Gerinnungsphasen einbezogen sind, sind Sulfatide, Ganglioside und Stearinsäure.

Als weiterführende Untersuchung für den Protaminsulfateffekt wäre nach einem geeigneten in-vitro-Modell zu suchen, das der Art der Gerinnungsauslösung über das endogene System im Blutkreislauf analog ist, und die Wirkung der polykationischen Verbindungen darauf festzustellen. Eine ausführlichere molekularbiologische Charakterisierung, evtl. mit gereinigten Faktoren in definierten Systemen, könnte ebenfalls einen weiteren Einblick in den Wirkungsmechanismus ermöglichen und auch darüber entscheiden, ob eine Erprobung der therapeutischen Nutzung dieses oder ähnlicher Effekte in Betracht gezogen werden kann.

Unabhängig von diesen Überlegungen wurde gezeigt, daß der am meisten verwendete Faktor VIII- und Faktor IX-Test - der Einphasen-Test basierend auf der PTT - durch nicht spezifische, sogar durch synthetische Substanzen normalisiert werden kann. Bei Versuchen zur Anreicherung und Charakterisierung von Faktor VIII- und Faktor IX-Aktivität sollte daher nicht immer vorausgesetzt werden, daß der Test die gewünschte biologische Aktivität mißt.

Literaturverzeichnis

1. Niewiarowski, S.; Stewart, G.J.
Interactions of blood cells with fibrinogen and polymerizing fibrin
in: Platelets: A multidisciplinary approach S. 131 - 147
Rawen Press New York 1978
2. Hemker, H.C.; Kop, J.; Willems, G.M.
Kinetic aspects of the interaction of blood clotting enzymes
VIII. The relation between clotting time and clotting velocity
Thromb. Haemostas. (Stuttg.) 41 , 309 - 313 (1979)
3. Ratnoff, O.D.; Colopy, J.E.
A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma
J. Clin. Invest. 34 , 602 - 613 (1955)
4. Niewiarowski, S.; Bańkowski, E.; Rogowicka, I.
Studies on the adsorption and activation of the Hageman factor (factor XII) by collagen and elastin
Thromb. Diath. Haemorrh. 14 , 387 - 400 (1965)
5. Wiggins, R.C.; Cochrane, Ch.C.
The autoactivation of rabbit Hageman factor
J. Exp. Med. 150 , 1122 - 1133 (1979)
6. Ratnoff, O.D.; Saito, H.
Amidolytic properties of single-chain activated Hageman factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 , 1461 - 1463 (1979)
7. Colman, R.W.; Mattler, L.; Sherry, S.
Studies on the prekallikrein (kallikreinogen)-kallikrein enzyme system of human plasma
J. Clin. Invest. 48 , 23 - 32 (1969)
8. Cochrane, C.G.; Revak, S.D.; Wuepper, K.D.
Activation of Hageman factor in solid and fluid phases
J. Exp. Med. 138 , 1564 - 1583 (1973)

9. Mandle, R.; Kaplan, A.P.
Hageman factor substrates
J. Biol. Chem. 252 , 6097 - 6104 (1977)
10. Fujikawa, K.; Helmark, R.L.; Kurachi, K.; Davie, E.W.
Activation of bovine factor XII (Hageman factor) by
plasma kallikrein
Biochemistry 19 , 1322 - 1330 (1980)
11. Kurachi, K.; Fujikawa, K.; Davie, E.W.
Mechanism of activation of bovine factor XI by factor XII
and factor XIIa
Biochemistry 19 , 1330 - 1338 (1980)
12. Saito, H.; Ratnoff, O.D.; Waldman, R.; Abraham, J.P.
Fitzgerald trait Deficiency of a hitherto unrecognized
agent ...
J. Clin. Invest. 55 , 1082 - 1089 (1975)
13. Schiffman, S.; Pecci, R.; Lee, P.
Contact activation of factor XI: Evidence that the primary
role of a contact activation cofactor (CAG) is to facilitate
the activation of factor XII
Thromb. Res. 10 , 319 - 323 (1977)
14. Griffin, J.H.; Cochrane, C.G.
Mechanisms for the involvement of high molecular weight
kininogen in surface-dependent reactions of Hageman factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 , 2554 - 2558 (1976)
15. Di Scipio, R.G.; Kurachi, K.; Davie, E.W.
Activation of human factor IX (Christmas factor)
J. Clin. Invest. 61 , 1528 - 1538 (1978)
16. Hultin, M.B.; Nemerson, Y.
Activation of factor X by factors IXa and VIII ; A specific
assay for factor IXa in the presence of thrombin-activated
factor VIII
Blood 52 , 928 - 940 (1978)

17. Elödi, S.; Váradi, K.
Optimization of conditions for the catalytic effect of
the factor IXa - factor VIII complex
Thromb. Res. 15 , 617 - 629 (1979)
18. Lechler, E.
Angeborene Koagulopathien in: Engelhardt, A.; Lommel, H.
(Hrsg.) Diagnostik hämorrhagischer Diathesen S. 15 - 28
Verlag Chemie Weinheim New York 1977
19. Walsh, P.N.
The effect of collagen and kaolin on the intrinsic coagulant
activity of platelets
Brit. J. Haematol. 22 , 393 - 405 (1972)
20. Kingdon, H.S.; Herion, J.C.; Rausch, P.G.
Cellular activation of factor IX (Christmas factor)
Throm. Res. 13 , 501 - 507 (1978)
21. Straub, W.; Duckert, F.
The formation of the extrinsic prothrombin activator
Thromb. Diath. Haemorrh. 5 , 402 - 425 (1961)
22. Radcliffe, R.D.; Nemerson, Y.
Activation of bovine factor VII by activated factor X
and thrombin
Fed. Proc. 34 , 259 (1975)
23. Jesty, J.; Nemerson, Y.
Purification of factor VII from bovine plasma
Reaction with tissue factor and activation of factor X
J. Biol. Chem. 25 , 509 - 515 (1974)
24. Fujikawa, K.; Titani, K.; Davie, E.W.
Activation of bovine factor X (Stuart factor):
Conversion of factor X α to factor X β
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 , 3359 - 3363 (1975)
25. Magnusson, S.; Petersen, T.E.; Sottrup-Jensen, L.; Claeys, H.
Complete primary structure of prothrombin
in: Reich, E.; Rifkin, D.B.; Shaw, E. (Hrsg.)
Proteases and biological control S. 123 - 149
Cold Spring Harbor Laboratory 1975

26. Østerud, B.; Miller-Andersen, M.; Abildgaard, U.; Prydz, H.
The effect of antithrombin III on the activity of the
coagulation factors VII, IX and X
Thrombos. Haemostas. (Stuttg.) 35 , 295 - 304 (1976)
27. Rapaport, S.I.; Schiffman, S.; Patch, M.J.; Ames, S.B.
The importance of activation of antihemophilic globulin
and proaccelerin by traces of thrombin in the generation
of intrinsic prothrombinase activity
Blood 21 , 221 - 236 (1963)
28. Østerud, B.; Rapaport, S.I.; Schiffman, S.; Chong, M.M.Y.
Formation of intrinsic factor X-activator activity, with
special reference to the role of thrombin
Brit. J. Haematol. 21 , 643 - 660 (1971)
29. Walsh, P.N.
Different requirements for intrinsic factor Xa forming
activity and platelet factor 3 activity and their relation-
ship to platelet aggregation and secretion
Brit. J. Haematol. 40 , 311 - 331 (1978)
30. Gader, A.M.A.; Clarkson, A.R.; Cash, J.D.
The plasminogen activator and coagulation factor VIII
responses to adrenalin, isoprenalin and sabutamol in man
Thromb. Res. 2 , 9 - 13 (1973)
31. Mannucci, P.M.; Åberg, M.; Nilsson, I.M.; Robertson, B.
Mechanism of plasminogen activator and factor VIII
increase after vasoactive drugs
Brit. J. Haematol. 30 , 81 - 93 (1975)
32. Radcliffe, R.; Bagdasarian, A.; Colman, R.; Nemerson, Y.
Activation of bovine factor VII by Hageman factor fragments
Blood 50 , 611 - 617 (1977)
33. Kisiel, W.; Fujikawa, K.; Davie, E.W.
Activation of bovine factor VII (proconvertin) by factor XIIa
Biochemistry 16 , 4189 - 4194 (1977)

34. Kalousek, F.; Konigsberg, W.; Nemerson, Y.
Activation of factor IX by activated factor X: A link
between the extrinsic and intrinsic coagulation systems
FEBS Lett. 50 , 382 - 385 (1975)
35. Østerud, B.; Rapaport, S.I.
Activation of factor IX by the reaction product of tissue
factor and factor VII: Additional pathway for initiating
blood coagulation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 , 5260 - 5264 (1977)
36. Zwaal, R.F.A.
Membrane and lipid involvement in blood coagulation
Biochem. Biophys. Acta 515 , 163 - 205 (1978)
37. Esmon, Ch.T.; Suttie, J.W.
The functional significance of vitamin K action
Difference in phospholipid binding between normal and
abnormal prothrombin
J. Biol. Chem. 250 , 4095 - 4099 (1975)
38. Esmon, Ch.T.; Sadowski, J.A.; Suttie, J.W.
A new carboxylation reaction The vitamin K-dependent
incorporation of $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ into prothrombin
J. Biol. Chem. 250 , 4744 - 4748 (1975)
39. Nelsestuen, G.L.; Kisiel, W.; Di Scipio, R.G.
Interaction of vitamin K dependent proteins with membranes
Biochemistry 17 , 2134 - 2138 (1978)
40. Joist, J.H.; Dolezel, G.; Lloyd, J.V.; Kinlough-Rathbone, R.L.;
Mustard, J.F.
Platelet factor 3 availability and the platelet release
reaction
J. Lab. Clin. Med. 84 , 474 - 482 (1974)
41. Miletich, J.P.; Marejus, D.W.; Marejus, P.W.
Patients with congenital factor V deficiency have decreased
factor Xa binding sites on their platelets
J. Clin. Invest. 62 , 824 - 831 (1978)

42. Salzman, E.W.
Measurement of platelet adhesiveness
A simple in vitro technique demonstrating an abnormality
in von Willebrand's disease
J. Lab. Clin. Med. 62 , 724 - 735 (1963)
43. Weiss, H.J.; Rogers, J.; Brand, H.
Defective ristocetin-induced platelet aggregation in von
Willebrand's disease and its correction by factor VIII
J. Clin. Invest. 52 , 2697 - 2707 (1973)
44. Weiss, H.J.
Relation of von Willebrand factor to bleeding time
New Engl. J. Med. 291 , 420 (1974)
45. Larrieu, M.J.; Caen, J.P.; Meyer, D.O.; Path, F.C.;
Vainer, H.; Sultan, Y.; Bernard, J.
Congenital bleeding disorders with long bleeding time
and normal platelet count
Am. J. Med. 45 , 354 - 372 (1968)
46. Zimmermann, T.S.; Ratnoff, O.D.; Powell, A.E.
Immunologic differentiation of classic hemophilia
(factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease
J. Clin. Invest. 50 , 244 - 254 (1971)
47. Newman, J.; Harris, R.B.; Johnson, A.J.
Molecular weights of antihemophilic factor and von
Willebrand factor proteins in human plasma
Nature 263 , 612 - 613 (1976)
48. Bennett, B.; Forman, W.B.; Ratnoff, O.D.
Studies on the nature of antihemophilic factor (factor VIII)
J. Clin. Invest. 52 , 2191 - 2197 (1973)
49. Perret, B.A.; Furlan, M.; Beck, E.A.
Studies on factor VIII-related protein
II. Estimation of molecular size differences between
factor VIII oligomers
Biochem. Biophys. Acta 578 , 164 - 174 (1979)

50. Van Mourik, J.A. ; Bouma, B.N. ; La Bruyère, W.T. ; de Graaf, S. ; Mochtar, I.A.
F VIII, a series of homologous oligomers and a complex of two proteins
Thromb. Res. 4 , 155 - 164 (1974)
51. Van Mourik, J.A. ; Bolhuis, P.A.
Dispersity of human factor VIII - von Willebrand factor
Thromb. Res. 13 , 15 - 24 (1978)
52. Furlan, M. ; Perret, B.A. ; Beck, E.A.
Studies on factor VIII-related protein
III. Size distribution and carbohydrate content of human and bovine factor VIII
Biochem. Biophys. Acta 579 , 325 - 333 (1979)
53. Hershgold, E.J. ; Davison, A.M. ; Janszen, M.E.
Isolation and some chemical properties of human factor VIII (antihemophilic factor)
J. Lab. Clin. Med. 77 , 185 - 205 (1971)
54. Owen, W.G. ; Wagner, R.H.
Antihemophilic factor: Separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents
Thromb. Diath. Haemorrh. 27 , 502 - 515 (1972)
55. Rick, M.E. ; Hoyer, L.W.
Molecular weight of human factor VIII procoagulant activity
Thromb. Res. 7 , 909 - 916 (1975)
56. Kang, E.P. ; Cruickshank, W.H. ; Rock, G.
Visualization of low molecular weight factor VIII purified in the presence of benzamidine
Thromb. Res. 17 , 337 - 346 (1980)
57. Rock, G. ; Palmer, D. ; Kang, E. ; Jamieson, G. ; Cruickshank, W.H.
Characterization of low molecular weight factor VIII in:
Abstracts of the VIIth international congress on thrombosis and haemostasis S. 411
Schattauer Verlag Stuttgart - New York 1979

58. Barrow, E.S. ; Reisner, H.M. ; Graham, J.B.
The separation of von Willebrand factor from factor
VIII-related antigen
Brit. J. Haematol. 42 , 455 - 468 (1979)
59. Gralnick, H.R. ; Collier, B.S.
Carbohydrate deficiency of the factor VIII/von Willebrand
factor protein in von Willebrand's disease variants
Science 192 , 56 - 59 (1976)
60. Gralnick, H.R.
Factor VIII/von Willebrand factor protein. Galactose a
cryptic determinant of von Willebrand factor activity
J. Clin. Invest. 62 , 496 - 499 (1978)
61. Piovela, F. ; Nalli, G. ; Malamani, G.D. ; Majolino, I. ;
Frassoni, F. ; Sitar, G.M. ; Ruggeri, A. ; Dell'Orbo, C. ;
Ascari, E.
The ultrastructural localization of factor VIII-antigen
in human platelets, megacaryocytes and endothelial cells
utilizing a ferritin-labelled antibody
Brit. J. Haematol. 39 , 209 - 213 (1978)
62. Owen, Ch.A. ; Bowie, E.J.W. ; Fass, D.N.
Generation of factor VIII coagulant activity by isolated,
perfused neonatal pig livers and adult rat livers
Brit. J. Haematol. 43 , 307 - 315 (1979)
63. Stead, N.W. ; McKee, P.A.
The effect of cultured endothelial cells on factor VIII
procoagulant activity
Blood 54 , 560 - 572 (1979)
64. Seghatchian, M.J.
The usefulness of chromogenic substrates in the diagnosis
of haemophilia and control of blood products in:
Scully, M.F. ; Kakkar, V.V. (Hrsg.) Chromogenic peptide
substrates S. 102 - 116
Churchill Livingstone Edinburgh 1979
65. Tocantins, L.B.
Hemophilic syndromes and hemophilia
Blood 9 , 281 - 285 (1954)

66. Johnson, S.A. ; Seegers, W.H.
Studies on the plasma defect in hemophilia
Rev. Hématol. 9 , 529 - 535 (1954)
67. Mammen, E.
Investigations on the nature of hemophilia A
Thromb. Diath. Haemorrh. 9 , 30 - 52 (1963)
68. Mingers, A.M.
Studies on factor VIII activation potential in hemophilia A-plasma and its significance for the comprehension of hemophilia
Europ. J. Pediat. 123 , 187 - 198 (1976)
69. Mingers, A.M.
In vitro studies on the way in which the activation of factor VIII is affected in mixtures of plasma with hemophilia A plasma
Europ. J. Pediat. 123 , 199 - 213 (1976)
70. Peake, I.R. ; Bloom, A.L. ; Giddings, J.C. ; Ludlam, C.A.
An immunoradiometric assay for procoagulant factor VIII antigen: Results in hemophilia, von Willebrand's disease and fetal plasma and serum
Brit. J. Haematol. 42 , 269 - 281 (1979)
71. Rock, G.A. ; Palmer, D.S. ; Cruickshank, W.H.
Visualization of F VIII:-C-like material in a CRM negative hemophiliac
Thromb. Res. 16 , 747 - 757 (1979)
72. Shanberge, J.N. ; Gore, I.
Studies on the immunologic and physiologic activities of antihemophilic factor (AHF)
J. Lab. Clin. Med. 50 , 954 (1957)
73. Meyer, D. ; Lavergne, J.-M. ; Larrieu, M.-J. ; Josso, F.
Cross-reacting material in congenital factor VIII deficiencies (hemophilia A and von Willebrand's disease)
Thromb. Res. 1 , 183 - 196 (1972)
74. Landbeck, G. ; Kurme, A.
Verhütung körperbehindernder Blutungsfolgen bei schwerer und mittelschwerer Hämophilie
Med. Welt 24 , 763 - 768 (1973)

75. Kurme, A.; Landbeck, G.
Vorbeugende Substitutionstherapie bei Kindern und Jugendlichen mit schwerer Hämophilie
in: Proceedings of the II. European meeting of the world federation of hemophilia Heidelberg 1973
Deutsche Hämophiliegesellschaft München 1974
76. Kasper, C.K.
Self-infusion treatment program
in: Brinkhous, K.M.; Hemker, H.C. (Hrsg.)
Handbook of hemophilia S. 597 - 606
Excerpta Medica Amsterdam 1975
77. Mannucci, P.M.; Ruggeri, Z.M.; Pareti, F.I.; Capitanio, A.
1-Deamino-8-D-Arginin-Vasopressin: A new pharmacological approach to the management of hemophilia and von Willebrand's disease
Lancet 1 , 869 - 872 (1977)
78. Sutor, A.H.; Arends, P.; Pollmann, H.
Intranasale Anwendung von DDAVP bei schwerer Hämophilie A und Hemmkörperhämophilie A
in: Sutor, A.H. (Hrsg.) DDAVP-Anwendung bei Blutern
S. 109 - 114
Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1980
79. Schimpf, K.; Zimmermann, K.
Hepatitis-häufigkeit, serologische Befunde und Leberhistologie nach Therapie schwerer hämorrhagischer Diathesen mit Gerinnungsfaktorkonzentraten
Blut 38 , 70 - 71 (1979)
80. Suomela, H.
Human coagulation factor IX. Isolation and characterization
Eur. J. Biochem. 71 , 145 - 154 (1976)
81. Fujikawa, K.; Thompson, A.R.; Legaz, M.E.; Meyer, R.G.; Davie, E.W.
Isolation and characterization of bovine factor IX (Christmas factor)
Biochemistry 12 , 4938 - 4945 (1973)

82. Fujikawa, K.; Legaz, M.E.; Kato, H.; Davie, E.W.
The mechanism of activation of bovine factor IX by
bovine factor XIa
Biochemistry 13 , 4508 - 4516 (1974)
83. Parekh, V.R.; Mannucci, P.M.; Ruggeri, Z.M.
Immunological heterogeneity of hemophilia B:
A multicentre study of 98 kindreds
Brit. J. Haematol. 40 , 643 - 655 (1978)
84. Ørstavik, K.H.
Electroimmunoassay of factor IX antigen: Increased sensi-
tivity by enzyme amplification of immunoprecipitates
Thromb. Res. 15 , 721 - 726 (1979)
85. Heene, D.
Hämorrhagische Diathesen in: Begemann, H. (Hrsg.)
Klinische Hämatologie S. 699 - 700
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1975
86. von Kaulla, E.; von Kaulla, K.N.
Ansteigen von Faktor VIII-(Antihämophiles Globulin)-
Aktivität im Plasma von Hämophilen nach Zusatz synthetischer
fibrinolytischer Verbindungen
Klin. Wschr. 51 , 706 - 708 (1973)
87. Barrow, E.M.; Graham, J.B.
Factor VIII (AHF) activity of small size produced by
succinylating plasma
Am. J. Physiol. 222 , 134 - 141 (1972)
88. Barrow, E.M.; Lester, R.H.; Johnson, A.M.; Graham, J.B.
Production of antihemophilic (factor VIII) activity
from albumin
Am. J. Physiol. 222 , 920 - 927 (1972)
89. Barrow, E.S.; Graham, J.B.
Polyglutamic and polyaspartic acids: Synthetic polypeptides
with predominantly factor VIII-like coagulant activity
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152 , 160 - 164 (1976)

90. Ando, T.; Yamasaki, M.; Suzuki, K.
Protamines Isolation, characterization structure and
function
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York 1973
91. Jaques, L.B.; Saskatoon, S.
Protamine - antagonist to heparin
C. M. A. Journal 108 , 1291 - 1297 (1973)
92. Esnouf, M.P.
Biochemistry of blood coagulation
Brit. Med. Bull. 33 , 213 - 218 (1977)
93. Langdell, R.D.; Wagner, R.H.; Brinkhous, K.M.
Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests
J. Lab. Clin. Med. 41 , 637 - 647 (1953)
94. Ratnoff, O.D.; Crum, J.D.
Activation of Hageman factor by solutions of ellagic acid
J. Lab. Clin. Med. 63 , 359 - 377 (1964)
95. Quick, A.J.
The thromboplastin reagent for the determination of
prothrombin
Science 92 , 113 - 114 (1940)
96. Karges, H.E.; Schwinn, H.; Becker, U.; Heimburger, N.
Großer Gerinnungsstatus
Behringwerke AG Marburg/Lahn 1979
97. Vinazzer, H.
Faktorenanalyse in: Engelhardt, A.; Lommel, H. (Hrsg.)
Diagnostik hämorrhagischer Diathesen S. 55 - 65
Verlag Chemie Weinheim New York 1977
98. Laurell, C.B.
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis
in agarose gel containing antibodies
Anal. Biochem. 15 , 45 - 52 (1966)
99. Clarke, M.H.G.; Freeman, T.
Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins
Clin. Sci. 35 , 403 - 413 (1968)

100. Axen, R. ; Porath, J. ; Ernback, S.
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides
by means of cyanogen halides
Nature 214 , 1302 - 1303 (1967)
101. Piepkorn, M.W. ; Schmer, G. ; Lagunoff, D.
Isolation of high-activity heparin by DEAE-Sephadex and
protamin-Sepharose chromatography
Thromb. Res. 13 , 1077 - 1087 (1978)
102. Bradford, M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities of protein utilizing the principle
of protein-dye binding
Anal. Biochem. 72 , 248 - 254 (1976)
103. Teien, A.N. ; Lie, M.
Evaluation of an amidolytic heparin assay method:
Increased sensitivity by adding purified antithrombin III
Thromb. Res. 10 , 399 - 410 (1977)
104. Ferguson, J.H.
The action of heparin, serum albumin and salmine on
blood clotting
Am. J. Physiol. 130 , 759 - 770 (1940)
105. Mylon, E. ; Winternitz, M.C. ; De Sütö-Nagy, G.J.
The determination of fibrinogen with protamine
J. Biol. Chem. 143 , 21 - 27 (1942)
106. Landaburu, R.H. ; Seegers, W.H.
Activation of prothrombin
Am. J. Physiol. 193 , 169 - 180 (1958)
107. Bock, P.E. ; Srinivasan, K.R. ; Shore, J.D.
Activation of factor XII (Hageman factor) in solution
by ellagic acid
in: Abstracts of the VIIth international congress on
thrombosis and haemostasis S. 35
Schattauer Verlag Stuttgart - New York 1979

108. Sampaio, C.A.M.; Saad, A.D.; Grisolia, D.
Hydrolysis of histones by horse urinary kallikreins
Separatum Experientia 33 , 292 - 293 (1977)
109. Hemker, H.C.; Vermeer, C.; Govers-Riemslog, J.
Kinetic aspects of the interaction of blood clotting
enzymes VII. The relation between clotting time and
prothrombin concentration
Thrombos. Haemostas. (Stuttg.) 37 , 81 - 85 (1977)
110. Hemker, H.C.; Siepel, T.; Altman, R.; Loeliger, E.A.
Kinetic aspects of the interaction of blood clotting
enzymes II. The relation between clotting time and
plasma concentration in prothrombin-time estimations
Thrombos. Haemostas. (Stuttg.) 17 , 349 - 357 (1967)
111. Karlson, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie 9. Aufl. S. 70 - 73
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974
112. Summaria, L.; Arzadon, L.; Bernabe, P.; Robbins, K.C.
The interaction of streptokinase with human, cat, dog
and rabbit plasminogens
J. Biol. Chem. 249 , 4760 - 4769 (1974)
113. Soulier, J.P.; Prou, O.; Halle, L.
Further studies on thrombin-coagulase
Thromb. Diath. Haemorrh. 23 , 37 - 49 (1970)
114. Revak, S.D.; Cochrane, Ch.G.; Bouma, B.N.; Griffin, J.H.
Surface and fluid phase activities of two forms of
activated Hageman factor produced during contact activation
of plasma
J. Exp. Med. 147 , 719 - 729 (1978)
115. Kato, H.; Han, Y.N.; Iwanaga, S.; Hashimoto, N.; Sugo, T.;
Fuji, S.; Suzuki, T.
Mammalian plasma kininogens: Their structures and functions
in: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Suzuki, T. (Hrsg.)
Kininogenases 4: Kallikrein S. 63 - 72
Schattauer Verlag Stuttgart- New York 1977

116. Thomson, R.E.; Mandle, R.; Kaplan, A.P.
Association of factor XI and high molecular weight
kininogen in human plasma
J. Clin. Invest. 60 , 1376 - 1380 (1977)
117. Hougie, C.
Anticoagulant action of protamin sulphate
Proc. Soc. Exp. Biol. 98 , 130 - 133 (1958)
118. Neumüller, O.-A.
Römpps Chemie-Lexikon S. 1718 - 1719
Frank'sche Verlagshandlung Stuttgart 1973
119. Nossel, H.L.; Rubin, H.; Drillings, M.; Hsieh, R.
Inhibition of Hageman factor activation
J. Clin. Invest. 47 , 1172 - 1180 (1968)
120. Miyake, S.
Die isoelektrischen Punkte der Protamine
Z. physiol. Chemie 172 , 225 - 229 (1927)
121. Nossel, H.L.
The contact system in: Biggs, R. (Hrsg.) Human blood
coagulation, haemostasis and thrombosis S. 79 - 132
Blackwell Scientific Publications Oxford 1972
122. Saito, H.; Ratnoff, O.D.; Donaldson, V.H.; Haney, G.;
Pensky, J.
Inhibition of the adsorption of Hageman factor (factor XII)
to glass by normal human plasma
J. Lab. Clin. Med. 84 , 62 - 73 (1974)
123. Altman, R.; Hemker, H.C.
Contact activation in extrinsic blood clotting system
Thromb. Diath. Haemorrh. 18 , 522 - 531 (1967)
124. Kitani, T.; Nagarajan, S.C.; Shanberge, J.N.
Effect of protamine on heparin-antithrombin III complexes.
In vitro studies
Thromb. Res. 17 , 367 - 374 (1980)

125. Biggs, R.; Douglas, A.S.
The thromboplastin generation test
J. Clin. Path. 6 , 23 - 29 (1953)
126. Seegers, W.H.; Ghosh, A.
The activation of factor X and factor X with factor
VII or protein M
Thromb. Res. 17 , 501 - 506 (1980)
127. Zacharski, L.R.; Rosenstein, R.
Failure of collagen to activate factor XII
Thromb. Res. 7 , 929 - 933 (1975)

Bei Herrn Prof. Dr. E. Zimmermann
bedanke ich mich für die Überlassung
des Themas und seine freundliche
Unterstützung bei der Durchführung
der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern
des Labors für Blutgerinnungsforschung
für ihre stete Hilfsbereitschaft bei allen
labortechnischen Fragen und Problemen

Lebenslauf

Name: Wolfgang Diethelm Prohaska

Geburtsdatum: 27. Mai 1953

Geburtsort: Löhne/Westfalen

Eltern: Johann Prohaska, Tischler
und Ehefrau Hedwig, geb. Müller

Schulbesuch: von 1959 bis 1967 Grund- und Hauptschule
in Löhne-Mennighüffen

Berufsausbildung: aus gesundheitlichen Gründen Beginn einer
Berufsausbildung zum Radio- und Fernseh-
techniker erst im Frühjahr 1970 in der
Stiftung Dr. Dormagen, Köln;
Abschluß der Ausbildung am 15. Februar 1973
mit der Gesellenprüfung

Berufstätigkeit: von Mai 1973 bis August 1973 bei der
Firma Picker Röntgen GmbH in Espelkamp

2. Bildungsweg: Besuch des Westfalen-Kollegs in Bielefeld
ab August 1973, Abschluß mit dem
Reifezeugnis am 15. Dezember 1975

Studium: Beginn des Medizinstudiums an der
Westfälischen Wilhelms-Universität in
Münster zum Sommersemester 1976,
Ärztliche Vorprüfung am 22. März 1978 in
Münster, 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
am 21. August 1981 in Münster;
zur Zeit im Praktischen Jahr an der Univer-
sitätsklinik in Münster

